

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REGULATION VON CHEMOKINE-LIKE RECEPTOR 1 IN HEPATISCHEN
STERNZELLEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Neumann

2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REGULATION VON CHEMOKINE-LIKE RECEPTOR 1 IN HEPATISCHEN
STERNZELLEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Neumann

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christa Büchler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
Tag der mündlichen Prüfung:	

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	8
1.1	Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)	8
1.1.1	Pathogenese	9
1.1.2	Symptome und Therapie	11
1.1.3	Hepatische Sternzellen und die NAFLD	11
1.2	Chemerin	13
1.2.1	Struktur und Prozessierung	13
1.2.2	Rezeptoren.....	13
1.2.3	Die biologische Rolle	14
1.2.4	Chemerin und die NAFLD	16
2.	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Puffer und Lösungen	21
2.1.4.1	Lösungen für Arbeiten mit Protein	21
2.1.4.2	Lösungen für Arbeiten mit RNA	25
2.1.5	Kit-Systeme	25
2.1.6	Oligonukleotide	25
2.1.7	Zellen.....	26
2.1.8	Wachstums- und Stimulationsmedien	26
2.1.9	Stimulanzien.....	26
2.1.10	Patientenkollektiv	27
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Arbeiten mit Zellen	27
2.2.1.1	Primäre hepatische Sternzellen.....	27
2.2.1.2	LX-2 humane hepatische Sternzelllinie.....	27
2.2.1.3	Zellen auftauen	28
2.2.1.4	Zellkultivierung	28
2.2.1.5	Zellpassagierung	28

2.2.1.6	Zellzählung	28
2.2.1.7	Zellstimulation	29
2.2.1.8	Laktat-Dehydrogenase Zytotoxizitäts-Assay.....	30
2.2.1.9	Zellen einfrieren.....	30
2.2.2	Arbeiten mit DNA	30
2.2.2.1	Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	30
2.2.3	Arbeiten mit RNA	32
2.2.3.1	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	32
2.2.3.2	Reverse Transkription.....	32
2.2.4	Arbeiten mit Protein	33
2.2.4.1	Proteinisolierung aus Zellen	33
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	33
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.2.4.4	Western Blotting (Wet Transfer Verfahren) und immunologischer Nachweis	34
2.2.4.5	Coomassie Färbung	36
2.2.4.6	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	36
2.2.5	Statistische Auswertung	37
3.	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Untersuchung hepatischer CMKLR1 mRNA in einem NAFLD-Patientenkollektiv ...	38
3.1.1	Charakterisierung des Kollektivs	38
3.1.2	CMKLR1 mRNA in der Leber.....	41
3.1.3	Hepatische CMKLR1 mRNA in der NAFLD.....	41
3.1.4	Hepatische CMKLR1 mRNA in weiblichen NAFLD-Patienten	43
3.1.5	Hepatische CMKLR1 mRNA in männlichen NAFLD-Patienten	45
3.2	Regulation von CMKLR1 Protein durch Zytokine und Lipopolysaccharid	47
3.2.1	Stimulationsversuche mit IL-6	48
3.2.2	Stimulationsversuche mit Leptin.....	48
3.2.3	Stimulationsversuche mit Lipopolysaccharid	48
3.2.4	Stimulationsversuche mit TGF- β	49
3.2.5	Stimulationsversuche mit TNF- α	49
3.3	Regulation von Chemerin Protein durch Zytokine und Lipopolysaccharid.....	51
3.3.1	Stimulationsversuche mit IL-6	52
3.3.2	Stimulationsversuche mit Leptin.....	52
3.3.3	Stimulationsversuche mit Lipopolysaccharid	53

3.3.4	Stimulationsversuche mit TGF- β	54
3.3.5	Stimulationsversuche mit TNF- α	55
4.	DISKUSSION	57
4.1	Untersuchung hepatischer CMKLR1 mRNA in einem NAFLD-Patientenkollektiv ...	57
4.2	Regulation von CMKLR1 Protein durch Zytokine und Lipopolysaccharid	60
4.3	Regulation von Chemerin Protein durch Zytokine und Lipopolysaccharid.....	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	64
6.	LITERATURVERZEICHNIS	66
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70
8.	TABELLENVERZEICHNIS	73
9.	PUBLIKATIONEN.....	74
DANKSAGUNG		

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CCRL2	C-C motif receptor like 2
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1
cp	Crossing point
C-terminal	Carboxy-terminal
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET-1	Endothelin-1
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGT	γ -Glutamyltransferase
GPR1	G protein-coupled receptor 1
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Humane Sternzelle
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
KLK7	Kallikrein 7
LDH-Assay	Laktat-Dehydrogenase Zytotoxizitäts-Assay
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein-Kinase
MCD	Methionin-Cholin-defizient
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD activity score
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
N-terminal	Amino-terminal
OD ₂₆₀	Optischen Dichte bei 260 nm
OD ₂₈₀	Optischen Dichte bei 280 nm

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHH	Primärer humaner Hepatozyt
PNPLA3	Palatin-like phospholipase domain-containing 3 gene
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
rev	Reverse
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline + Tween
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TIG2	Tazarotene-induced gene 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
uni	Universe

1. Einleitung

1.1 Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Erste Fallberichte über Lebererkrankungen bei übergewichtigen Patienten mit unauffälligem Alkoholkonsum, die bis zur Zirrhose fortschreiten können, gab es bereits vor 40 Jahren. Erst in den letzten zehn Jahren jedoch wurde, auch bedingt durch die Zunahme an übergewichtigen und fettleibigen Menschen in den westlichen Industrienationen, die Dringlichkeit dieses Problems erkannt. So liegt die Prävalenz der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) in westlichen Ländern bei circa 30 %. Wird nur die adipöse Bevölkerung betrachtet, so liegt die Prävalenz bei Menschen mit einem Body-Mass-Index (BMI) > 30 kg/m² deutlich höher bei 65 - 75 % bzw. sogar bei 85 - 90 % bei Menschen mit einem BMI > 35 kg/m² [2].

Die NAFLD ist eine chronische Lebererkrankung bei der exzessiver Alkoholkonsum (< 30 g/d bei Männern, < 20 g/d bei Frauen), Hepatitis B und C Infektionen sowie eine medikamenteninduzierte Leberverfettung als Ursache ausgeschlossen werden müssen [1]. Die NAFLD umfasst dabei verschiedene Schweregrade der Leberverfettung und Leberschädigung, die sich in Häufigkeit und Prognose unterscheiden. Hierbei ist besonders die Steatose, die reine Leberverfettung, von der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), Steatose mit hepatozellulären Schäden und Entzündung, zu unterscheiden. Diese Differenzierung erfolgt histologisch und häufig an Hand des *NAFLD activity score* (NAS). Hierbei wird die Verfettung, das *ballooning*, eine histologische Beschreibung des hepatozellulären Zelluntergangs bei dem die Zellen deutlich an Größe

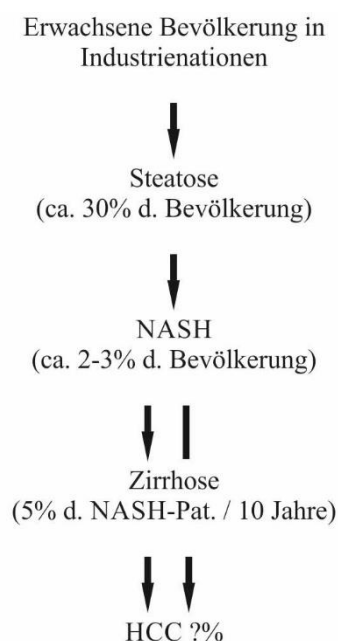


Abbildung 1: Das Spektrum der NAFLD (nach [2] und [3])

zunehmen, die Entzündung und der Fibrosegrad der Leber beurteilt [4]. Ist die Prognose bei der Steatose noch günstig, so entwickelt sich hingegen bei der NASH in etwa 5 % der Fälle innerhalb von zehn Jahren eine Leberzirrhose. Sowohl Patienten mit NASH als auch mit Leberzirrhose haben ein erhöhtes Risiko für ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) (s. Abb. 1) [3].

1.1.1 Pathogenese

Die Pathogenese der NAFLD ist ein komplexer Prozess und noch nicht gut verstanden und beschrieben. Aktuell geht man von einem „multiple hit process“ aus. Man vermutet, dass Insulinresistenz, oxidativer Stress, Apoptose und Serumspiegel von Adipokinen einen Einfluss auf die Entstehung der NAFLD haben [5] (s. Abbildung 2).

Auf Grund einer Insulinresistenz im Fettgewebe kommt es zu einer verminderten antilipolytischen Wirkung von Insulin. Es werden vermehrt Fettsäuren aus dem Fettgewebe freigesetzt, die in den Hepatozyten akkumulieren. Auch wird die de-novo-Fettsäuresynthese in der Leber gesteigert [6]. So stammen 26 % der akkumulierten freien Fettsäuren in der Leber von NAFLD-Patienten aus der hepatischen de-novo-Synthese, 59 % aus der gesteigerten Lipolyse des Fettgewebes und 15 % aus der Nahrung [5]. Da auch eine vermehrte Fettsäuresynthese der Leber zu einer Insulinresistenz beiträgt, kann die Insulinresistenz der Leber sowohl als Ursache als auch als Folge der hepatischen Steatose gesehen werden [5].

Auf Grund der Akkumulation von Lipiden wie freiem Cholesterin und freien Fettsäuren kommt es in den Hepatozyten zu Zelldysfunktionen und Apoptose. Ein Phänomen, das die Leberzellen mit allen Nicht-Fettgewebszellen teilen und welches Lipotoxizität genannt wird. Die Hepatozyten können aus den anströmenden Mengen an freien Fettsäuren nicht mehr in ausreichendem Maße

Triglyzeride synthetisieren, sodass es zu einem oxidativen Abbau kommt. In Folge dessen fallen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies an, die zu hepatozellulären Schäden führen [7] + [1]. Durch Akkumulation von freien Fettsäuren kommt es darüber hinaus zu einer Hochregulation des Fas-Liganden und Aktivierung des Fas-Rezeptors CD95.

Dies führt zu einer

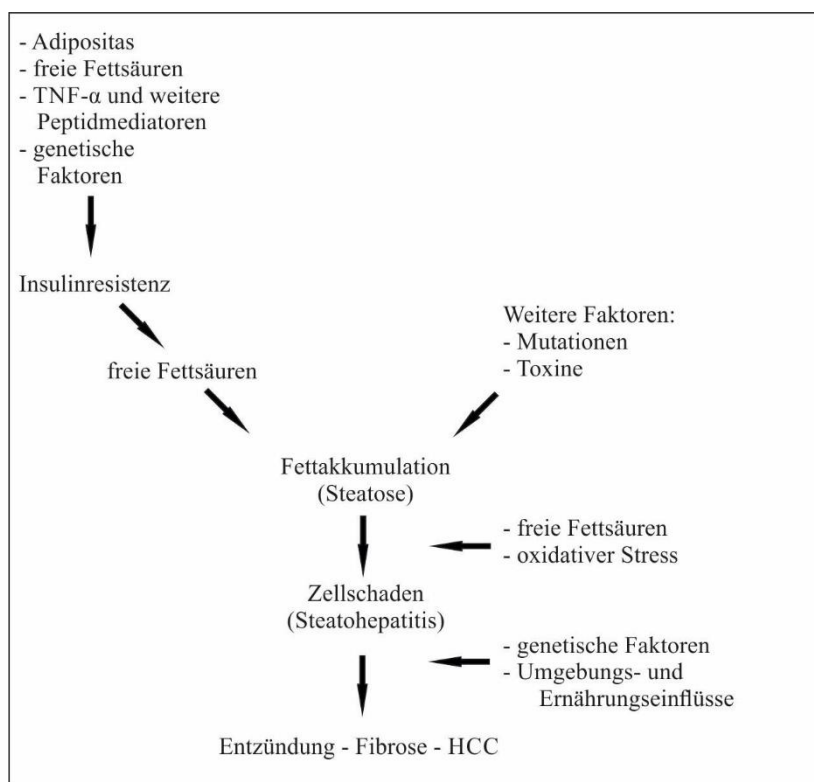


Abbildung 2: Mechanismen der Pathogenese der NAFLD (nach [1])

vermehrten Apoptose von Hepatozyten [5]. Auch scheint die hepatische Steatose selbst zu einer erhöhten Inflammation zu führen. So ist der Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) im Lebergewebe von Mäusen, die mit einer Hochfett-Diät gefüttert worden sind, erhöht. Eine Aktivierung von NFκB führt beispielsweise zu einer vermehrten Transkription der Entzündungsmediatoren *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), *interleukin 6* (IL-6) und *interleukin 1β* (IL-1β) [8]+[2].

Die Dysfunktion des Fettgewebes ist eine der entscheidendsten Komponenten bei der Pathogenese der NAFLD, werden doch, wie oben erwähnt, circa 60 % der in der Leber akkumulierten Fettsäuren von den Adipozyten freigesetzt. Besonders das viszerale Fettgewebe scheint hierbei eine wichtige Rolle einzunehmen. Obwohl dies durch epidemiologische Studien gut belegt ist, konnten bisher die einzelnen Faktoren nicht im Detail identifiziert werden. Es wird eine erhöhte Lipolyse der viszeralen im Vergleich zu den subkutanen Fettgeweben beschrieben. Dieses Fettgewebe setzt auch mehr IL-6 frei, wobei dies zu einem großen Teil von den lokalen Immunzellen synthetisiert wird. Neben IL-6 werden vom Fettgewebe, ähnlich einem endokrinen Organ, viele weitere Hormone und Zytokine wie beispielsweise TNF-α oder *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) freigesetzt [9]. Besonders interessant ist hier Adiponektin, dessen Synthese und zirkulierende Konzentration in der Adipositas vermindert ist. Es besitzt eine protektive Wirkung auf die Leber, indem es die hepatische Gluconeogenese und Lipogenese hemmt. Die Plasmaspiegel von Adiponektin korrelieren invers mit denen der Triglyzeride und sind bei Patienten mit NAFLD erniedrigt [5].

Genetische Variationen spielen eine Rolle in der vielschichtigen Pathogenese der NAFLD. So scheinen sie einer der Gründe zu sein, wieso es bei einem Teil der Patienten zu einem schnellen Voranschreiten der Krankheit zu Steatohepatitis und Zirrhose kommt und bei anderen Patienten dies nie geschieht. Dies konnte beispielsweise für einen *missense single-nucleotide polymorphism* im *palatin-like phospholipase domain-containing 3 gene* (PNPLA3) gezeigt werden. Für das PNPLA3-Gen ist eine Assoziation mit der hepatozytären Fettakkumulation und Insulinresistenz bekannt [5]. Ein Austausch von Cytosin (C) durch Guanin (G) führt in dem Protein zu einem Ersatz von Isoleucin durch Methionin. Der normal vorherrschende Genotyp scheint das CC Allel zu sein. In Individuen mit NASH scheint hingegen das CG Allel am häufigsten vorzuliegen und in einer Studie mit 2124 NAFLD Patienten konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz von NASH bei Patienten mit homozygotem GG Allel erhöht ist [10] + [1].

Der Gastrointestinaltrakt des Menschen ist mit einer immensen Zahl anaerober Bakterien besiedelt, die eine wichtige Rolle beispielsweise bei der Immunabwehr, der Verdauung und Aufnahme von Nahrungsbestandteilen oder der Vitaminsynthese spielen. Eine intakte Darmschleimhaut verhindert, dass Bakterien und Endotoxine (v.a. Lipopolysaccharide) aus dem Darmlumen in das Blut übertreten und so über das Portalvenöse System direkt die Leber erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit NAFLD die Permeabilität der Darmwand erhöht ist [11]. Darüber hinaus scheint bei der NAFLD die Funktion der Phagozytose der Kupffer-Zellen, spezialisierter Makrophagen des Lebergewebes, eingeschränkt zu sein, woraus eine schlechtere Immunabwehr resultieren könnte. Des Weiteren zeigen diese Zellen eine erhöhte Expression des *toll-like receptors 4* (TLR4) und somit eine verstärkte Response auf Endotoxin. Dies begünstigt den Übergang einer Steatose in eine NASH [12].

Bei Patienten mit durch Biopsie gesicherter NAFLD konnte ein Unterschied in der Zusammensetzung des Mikrobioms festgestellt werden. So konnte bei Patienten mit NASH verglichen mit Patienten mit reiner Steatose und gesunden Kontrollen ein höherer Anteil an *Clostridium coccoides* und ein geringerer Anteil an Bakterien der Gattung *Bakteroides/Prevotella* nachgewiesen werden [13].

1.1.2 Symptome und Therapie

Klinisch präsentiert sich die NAFLD zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist asymptomatisch. Einige Patienten zeigen Symptome wie Fatigue, rechtsseitige Oberbauchschmerzen oder Hepatosplenomegalie. Ist die NAFLD bereits vor Diagnosestellung in eine Leberzirrhose übergegangen, treten meist typische Symptome wie Aszites oder Splenomegalie auf. Eine Steatose ist teilweise mit erhöhten Serumkonzentrationen der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der γ -Glutamyltransferase (GGT) assoziiert [2]. Der kausale Therapieversuch der NAFLD ist die Gewichtsreduktion, welche individuell angepasst durch eine Umstellung des Lebensstils, unterstützende Medikation (z.B. Metformin) oder Adipositaschirurgie erfolgen sollte [14].

1.1.3 Hepatische Sternzellen und die NAFLD

Hepatische Sternzellen (HSCs) besitzen bei den fibrotischen Umbauprozessen von geschädigtem, entzündetem Leberparenchym eine entscheidende Rolle, so auch bei dem Übergang der nicht-alkoholischen Steatohepatitis zur Leberfibrose und im weiteren Verlauf zur Zirrhose. Bei normalen, inaktivierten Sternzellen handelt es sich um ruhende Zellen mit Sitz im Disse-Raum. Sie speichern im Darm resorbiertes Vitamin A und produzieren

extrazelluläre Matrix [15]. Die Aktivierung der Sternzellen verläuft in zwei Phasen, *initiation* und *perpetuation*, in denen sich die Sternzellen zu proliferativen und kontraktilen Myofibroblasten wandeln. Während der *initiation* Phase ist die parakrine Stimulation durch die Zellen der Umgebung (Kupffer-Zellen, Hepatozyten, Lymphozyten und sinusoidale Endothelzellen) entscheidend. Durch diese kommt es zu ersten Veränderungen der Extrazellulärmatrix. In der Phase *perpetuation* werden neben den stimulierenden parakrinen Einflüssen auch autokrine Zytokine wichtig. Hierbei scheinen *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β_1), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *endothelin-1* (ET-1) einen aktivierenden und *hepatocyte growth factor* (HGF) einen hemmenden Einfluss zu haben. Die Extrazellulärmatrix wandelt sich von lockerem retikulärem Bindegewebe (Typ-III-Kollagen) zu dichter liegendem Typ-I-Kollagen um [16] + [17].

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α ist bei Patienten mit NALFD vermehrt exprimiert. Es ist von einem Zusammenhang zwischen TNF- α und einer Fibrose des Lebergewebes auszugehen [18]. TNF- α ist einer der Mediatoren, die in der Phase *initiation* zu einer Aktivierung der hepatischen Sternzellen führen [16].

Lipopolysaccharid (LPS), ein bakterielles Endotoxin, scheint eine Rolle bei der Pathogenese der NAFLD und auch bei dem Übergang der Steatose zur Steatohepatitis zu spielen. So sind bei NAFLD-Patienten die Plasmaspiegel von *LPS-binding protein*, ein Protein, welches LPS bindet und bei Anwesenheit dieses Endotoxins gebildet wird, erhöht und sind auch bei Patienten mit einer NASH höher als bei Patienten, die nur an einer Steatose leiden [19]. Auch konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass bei Patienten mit NAFLD die Permeabilität der Darmwand erhöht ist, weswegen vermehrt bakterielles Endotoxin in das Blut übertreten kann [11]. LPS aktiviert unter anderem TLR4, ein Rezeptor, der auch bei der Aktivierung der hepatischen Sternzellen eine Rolle spielt und bei diesen zu einer Aktivierung von NF κ B führt. Ein TLR4-Knockout führte bei Tieren mit einer bewusst gesetzten Leberschädigung zu einer geringeren Fibrose verglichen mit den Kontrollen [16].

1.2 Chemerin

1.2.1 Struktur und Prozessierung

Bei dem Adipokin und Chemoattraktant Chemerin, wegen seiner Entdeckung in Hautzellen nach Tazarotenstimulation auch als *tazarotene-induced gene 2* (TIG2) bezeichnet, handelt es sich um ein 143 Aminosäuren großes Protein [20]. Exprimiert als Preprochemerin mit einer Größe von 163 Aminosäuren wird es nach Abspalten des 20 Aminosäuren langen N-terminalen Signalpeptids als inaktives Prochemerin sezerniert [21]. Durch proteolytische Prozessierung am C-terminalen Ende entstehen hieraus verschieden aktive Isoformen des Chemerins mit variierender Aminosäureanzahl [22]. So aktivieren unter anderem die Serin-Proteasen der Gerinnungskaskade und der Fibrinolyse Faktor XIIa und Plasmin ebenso Chemerin, wie das von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzte Cathepsin G und die Mastzelltryptase. Chemerin scheint somit unter anderem eine vernetzende Rolle zwischen dem Gerinnungssystem und der Rekrutierung *chemokine-like receptor 1* (CMKLR1)-exprimierender Entzündungszellen (Makrophagen und dendritische Zellen) zu besitzen [23]. Bei CMKLR1 handelt es sich um einen der drei bekannten Rezeptoren des Chemerins. Es wird vermutet, dass das kompetitive Binden verschiedener Chemerin-Isoformen an einen Rezeptor eine Art der Regulation darstellt. So scheint die Isoform Chemerin155A ein schwacher Antagonist des Chemerin157S, der Form mit der höchsten Aktivität, zu sein [24]. Bei Angabe der Länge der Chemerin Isoformen ist zu beachten, dass diese im Vergleich zu Präprochemerin angegeben werden. Das eigentlich sezernierte Protein ist um das 20 Aminosäuren lange Signalpeptid kürzer.

1.2.2 Rezeptoren

Für Chemerin sind neben CMKLR1 noch GPR1 (*G protein-coupled receptor 1*) und CCRL2 (*C-C motif receptor like 2*) als Rezeptoren bekannt.

Bei CMKLR1, auch bezeichnet als ChemR23, handelt es sich um ein hepta-helikales Transmembranprotein, das zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählt. CMKLR1 ist unter anderem auf der Oberfläche von humanen Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen exprimiert [21]. Ebenso ist CMKLR1 mit Hilfe von *fluorescence-activated cell sorting* bei unreifen plasmazytoiden dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, polymorphonukleären Leukozyten und dendritischen Zellen der Dermis detektierbar. Bei myeloischen dendritischen Zellen widersprechen sich die Untersuchungen. Neben diesen Zellen des angeborenen Immunsystems ist CMKLR1 auch auf Osteoklasten, Endothelzellen,

Epithelzellen der Mundschleimhaut, Muskelzellen der Gefäßwände und Adipozyten zu finden [25]. Speziell in der Leber ist CMKLR1 auf primären humanen Hepatozyten, Kupffer-Zellen, hepatischen Sternzellen, Endothelzellen und Epithelzellen der Gallengänge exprimiert [26]. Die intrazelluläre Signalweiterleitung ist nur in geringem Umfang untersucht. So scheint die Aktivierung von CMKLR1 zu einem Kalziumeinstrom, einer verminderten cAMP-Anreicherung und einer Phosphorylierung von p42 und p44 MAP-Kinasen in *chinese hamster ovary*-Zellen zu führen. Des Weiteren sind eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase und des Proteinkinase-B-Signalwegs in humanen Endothelzellen und eine Aktivierung der p38, p42 und p44 MAP-Kinasen und von NFκB in Skelettmuskelzellen beschrieben [22]. Neben Chemerin bindet auch Resolvin E1, ein Derivat mehrfach ungesättigter Fettsäuren und ein anti-inflammatorischer Mediator, an CMKLR1 [27]. Die Expression von CMKLR1 auf Mausemakrophagen wird durch klassische Stimulation dieser Zellen, beispielsweise mit Lipopolysaccharid (LPS), herunterreguliert. Wohingegen anti-inflammatorische Zytokine, wie *transforming growth factor* (TGF) β1 und β2, zu einer Hochregulierung von CMKLR1 führen. Dies deutet auf eine anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 hin [25].

Wie bei CMKLR1 handelt es sich auch bei den beiden anderen bekannten Rezeptoren GPR1 und CCRL2 um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Das Expressionsmuster von GPR1 unterscheidet sich gegenüber dem von CMKLR1 dahingehend, dass GPR1 nicht auf Monozyten, Makrophagen und peripheren Blutlymphozyten exprimiert wird, jedoch in Zellen des zentralen Nervensystems [22]. GPR1 ist hierbei phylogenetisch nahe verwandt mit CMKLR1 und scheint auch Chemerin mit einer vergleichbaren Affinität zu binden [28]. Über die funktionelle Rolle von GPR1 ist noch wenig bekannt.

CCRL2 wird von T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, jedoch nicht von B-Lymphozyten, exprimiert [29]. Bei CCRL2 führt das Binden von Chemerin, im Gegensatz zu den anderen beiden Rezeptoren, nicht zu einer Kalziummobilisation. Auch kommt es nicht, wie bei ähnlichen Rezeptoren („*chemokine interceptors*“ genannt), zu einer Internalisierung desselben. Dies führt zu der Annahme, dass CCRL2 Chemerin bindet, um die lokale Konzentration zu erhöhen und es CMKLR1-Rezeptoren benachbarter Zellen zugänglich zu machen [30].

1.2.3 Die biologische Rolle

...in der Haut:

Wurde Chemerin ursprünglich als erstes in der Haut entdeckt, so hat sich doch das Hauptaugenmerk der Forschung auf seine Rolle im metabolischen Stoffwechsel und als

Chemoattraktant gerichtet. Es scheint jedoch auch in der Haut eine immunmodulierende Wirkung zu besitzen. So konnte nachgewiesen werden, dass humanes Kallikrein 7 (KLK7), eine der am meisten vertretenen Proteasen in der Haut, Prochemerin zu aktivem Chemerin^{156F} prozessiert. Ist Prochemerin in gesunder Haut vor allem im *Stratum basale* der Epidermis und KLK7 im *Stratum corneum* lokalisiert, so sind in Biopsien psoriatischer Haut beide in der gesamten Epidermis zu finden. Die Aktivierung von Prochemerin könnte folglich eine Rolle bei der Psoriasis spielen [31]. Auch besitzt Chemerin antimikrobielle Eigenschaften. Chemerin-reiches Exsudat primärer Hautzellkulturen hemmt das Bakterienwachstum und ebenso ist Chemerin in antibakteriell wirksamen Mengen in den Überständen kultivierter Keratinozyten vorhanden. Hierbei scheint besonders der Bereich Val⁶⁶-P⁸⁵ eine wichtige Rolle zu spielen. Bei der chemotaktischen Aktivität von Chemerin durch Binden an CMKLR1 scheint hingegen der Bereich F¹⁴⁹-S¹⁵⁷ bedeutend zu sein, was dafür spricht, dass verschiedenen Proteinregionen verschiedene Funktionen zukommen [32].

...in der Immunabwehr:

Ob Chemerin im Immunsystem eine pro- oder anti-inflammatorische Rolle spielt wird diskutiert. So sind signifikante Mengen an aktivem Chemerin im Aszites von Patienten mit Ovarialkarzinom, Leberkarzinom oder ovariellern Hyperstimulationssyndrom ebenso wie in der Synovialflüssigkeit von Arthritispatienten zu finden. Auch scheint der Aktivitätsscore der Rheumatoiden Arthritis mit den Mengen an Chemerin im Plasma zu korrelieren. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Applikation von Chemerin bei Mäusen diese vor Peritonitis schützt [21, 22].

...bei Adipositas und metabolischen Erkrankungen:

Adipokinen, vom Fettgewebe freigesetzte Signalmoleküle wie beispielsweise Adiponektin oder Leptin, wird eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie von Fettleibigkeit und den damit verbundenen Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, NAFLD und kardiovaskulären Erkrankungen zugesprochen. Auch Chemerin wird zu der Gruppe der Adipokine gezählt und wird im Fettgewebe vor allem von Adipozyten exprimiert. Chemerin spielt auch eine Rolle in der Reifung von Adipozyten. So verschlechtert ein *knockdown* von Chemerin oder CMKLR1 mittels *small hairpin* RNA in 3T3-L1 Zellen, Zellen mit einem Adipozyten-ähnlichem Phänotyp, deren Differenzierung. Auch führt der *knockdown* von Chemerin bei ausdifferenzierten Adipozyten zu einer Veränderung der Expression von Genen mit einer Funktion im Glukose- und Lipidmetabolismus [33]. Übereinstimmend hiermit zeigten Ernst et al., dass CMKLR1 *knockout* Mäuse einen schlankeren Phänotyp mit

geringerer Körper- und Fettgewebsmasse zeigen. Dies führten sie auf eine verschlechterte Adipogenese zurück. Darüber hinaus zeigten CMKLR1^{-/-}-Mäuse eine schlechtere Glukosetoleranz, eine erniedrigte Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung und eine erniedrigte Glukoseaufnahme in Muskulatur und weißes Fettgewebe, was einen Zusammenhang zwischen Chemerin beziehungsweise CMKLR1 und Diabetes mellitus Typ 2 nahelegt [34]. Diesen Ergebnissen widersprechend konnte in weiteren Experimenten mit CMKLR1^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, dass der *knockout* keinen Einfluss auf die Glukosetoleranz und die Morphologie des Fettgewebes hat [35] + [36]. Auch zeigten die Tiere ein erhöhtes Gesamtkörpergewicht und ein erhöhtes Gewicht des Fettgewebes [35].

1.2.4 Chemerin und die NAFLD

Sowohl Chemerin als auch der Chemerin-Rezeptor CMKLR1 könnten eine Rolle in der Pathogenese der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung spielen.

So wurde von Kukla et al. 2010 festgestellt, dass die Menge an Chemerin im Serum sowohl bei Patienten mit diagnostizierter NAFLD gegenüber gesunden Probanden als auch bei Patienten mit einer NASH gegenüber Patienten mit einer reinen Steatose erhöht ist [37]. Dem widersprechend ergaben Untersuchungen an einem weiteren NAFLD-Patientenkollektiv keinen Zusammenhang zwischen der Menge an Chemerin im Serum und dem NAS. In diesen Untersuchungen konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der mRNA von sowohl Chemerin als auch CMKLR1 in der Leber bei zunehmenden BMI-Werten und im Vergleich von Patienten mit NASH zu Patienten ohne NASH festgestellt werden [38]. Die erhöhten mRNA-Werte von Chemerin in der Leber stehen dabei in Einklang mit Untersuchungen von Krautbauer et al. 2013, die erhöhtes Chemerin in der murinen NASH nachweisen konnten [39]. Während in Adipozyten LPS und inflammatorische Zytokine eine Erhöhung von Chemerin bewirken, zeigen diese Substanzen in Hepatozyten keinen Effekt. Deng et al. wiesen nach, dass Chemerin in den Hepatozyten über den *farnesoid X receptor* reguliert wird. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch eine erniedrigte Expression von Chemerin in der humanen und murinen NASH [40]. Eine weitere, humane Studie zeigt ebenfalls erniedrigte Chemerinkonzentrationen in Leberbiopsien von NASH-Patienten [41]. Die Regulation der Chemerinexpression in hepatischen Sternzellen wurde bisher nicht untersucht.

In Einklang mit der obig beschriebenen, vermehrten Expression von CMKLR1 in der Leber von Patienten mit NASH konnte von Zhang et al. gezeigt werden, dass ein Herunterregulieren von CMKLR1 in Kupffer-Zellen mit Hilfe des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitors Wortmannin zu einer verminderten hepatischen Steatose und Entzündung bei Mäusen unter

Hochfettdiät führt [42]. Diesem positiven Zusammenhang zwischen NASH und CMKLR1 widersprechend, wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass das CMKLR1-Protein in der Leber von Patienten mit Fettleber erniedrigt ist und auch nicht mit dem BMI der Patienten korreliert [26].

Die bisherigen Untersuchungen ergeben somit in Bezug auf die hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 bei NAFLD beziehungsweise NASH widersprüchliche Ergebnisse.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die hepatische CMKLR1-Expression in der humanen NAFLD zu untersuchen. Es sollte hierbei geklärt werden, ob CMKLR1 in der NAFLD reguliert ist. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine Funktion in dieser chronischen Lebererkrankung sein.

Die zweite Zielsetzung der Arbeit war es die Regulation von CMKLR1 in hepatischen Sternzellen zu untersuchen. Hierbei sollte der Einfluss verschiedener Adipokine und Entzündungsmediatoren mit bewiesener Rolle in der Pathogenese der NAFLD geklärt werden. Neben CMKLR1 wurden auch die Proteinexpressionen von Chemerin bestimmt und dessen Konzentrationen in den Zellüberständen gemessen. Diese Arbeiten sollten klären, ob eine differentielle Expression von CMKLR1 beziehungsweise Chemerin in der NAFLD auf eine veränderte Synthese in hepatischen Sternzellen zurückzuführen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon
Combitips	Eppendorf
Dampfsterilisations-Indikatorband	Omnilab
ELISA-Platte (96 well)	Corning Costar®
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	Bio-Rad
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Sterile Einmalspritzen (1,0 ml)	Braun Injekt®-F
Sterile Filterspitzen (10 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Sterile Filterspitzen (100 µl, 200 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Mircolance™
Sterilfilter	Milipore
Vakuum Sterifiltrationssystem (50 ml, 150 ml)	Millipore
Wägeschälchen	Omnilab
Whatman GB003 0,8 mm	VWR
Zellkulturflasche (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatte (6 Well, 12 Well)	BD Falcon
Zell Schaber	Sarstedt

2.1.2 Geräte

Autoklav Systec VX 150	Systec
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
CCD-Kamera	Rainbow
Elektrische Pipettierhilfe Multipette® plus	Eppendorf

Inkubationsschrank BBD 6220	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
iMark Microplate Reader	Bio-Rad
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Mikroskop DM IL und Zubehör	Leica
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS System (CCD-Kamerasystem)	Bio-Rad
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific
Nanodrop ND 200	Thermo Scientific
pH-Meter inoLab®	WTW
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Präzisionswaage 440-45N	Kern
Präzisionswaage PLE 200-3	Kern
Schüttler Rotamax 120	Heidolph
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf
Trans-Blot Cell Wet-Transferkammer	Bio-Rad
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
Vortexer Typ 54117	Heidolph
Vortexer VF2	Janke und Kunkel
Vortexer Vortex 1	Ika
Wasserbad WPE 45	Memmert
Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments

2.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung 40%	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad

β-Mercaptoethanol	Sigma
Biosafe™ Coomassie	Bio-Rad
Bisacrylamidlösung 2%	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA für ELISA	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholat	Sigma
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose	Biochrom
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose	Merck
Ethanol	Merck
Ethanol, technisch	Chemikalienausgabe
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Igepal	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen/Gibco
Magermilchpulver	Frema
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
Penicillin/Streptomycin	Pan Biotech
PeqGOLD Proteinmarker	Peqlab
Phosphate buffered saline (PBS) Dulbecco	Sigma
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Schwefelsäure, rauchend	Merck
Tris-HCL	Merck
Tris-NH ₃	Merck

Tween® 20

Sigma

2.1.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden die Zusammensetzungen der selbst gemischten Puffer und Lösungen aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.4.1 Lösungen für Arbeiten mit Protein

2.1.4.1.1 Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten

RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	16,5	ml
Igepal	3,30	ml
Desoxycholat	1,65	g
SDS, 20%ige Stammlösung	1,65	ml
Tris, 1M Stammlösung pH 7,5	16,5	ml
	ad	0,30 l ddH ₂ O

Der RIPA-Lysepuffer wurde bei 4°C aufbewahrt. Vor Verwendung wurden zu jeweils 10 ml RIPA-Puffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugegeben.

2.1.4.1.2 Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	122	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS, 20% Stammlösung	50	ml
	ad	1 l ddH ₂ O

Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	45,0	ml
Bisacrylamid 2%	10,5	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	15,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,60	ml
ddH ₂ O	59,0	ml

Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0 ml
Bisacrylamid 2%	2,6 ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 6,8	5,0 ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2 ml
ddH ₂ O	24,0 ml

Acrylamid und Bisacrylamid wurden ebenso wie die Lösungen für die 15%igen Trenngele und die 5%igen Sammelgele bei 4°C gelagert. Um die Polymerisation zu starten, wurde zu der Lösung für Trenngele bei der Gelherstellung frisch 10%ige APS-Lösung in einem Verhältnis 1:100 und TEMED in einem Verhältnis von 1:333 zugegeben. Zu der Lösung für Sammelgele wurde 10%ige APS-Lösung in einem Verhältnis von 1:200 und TEMED in einem Verhältnis von 1:333 zugegeben.

SDS-Probenpuffer (5xLämmli), 5-fach:

Glyzerin 20%	5,0 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,3 ml
β-Mercaptoethanol	1,0 ml
SDS, 20%ige Stammlösung	2,0 ml
Bromphenolblau	0,025 g
ad	10,0 ml ddH ₂ O

Der SDS-Probenpuffer wurde in einem Verhältnis von 1:5 zu den Proteinlysaten zugegeben.

2.1.4.1.3 Lösungen für das Western Blotting

Tank-Puffer, 10-fach:

Glyzin	140 g
Tris-NH ₃	30 g
SDS	5 g
ad	1 l ddH ₂ O

Wet-Transfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200 ml
Tank-Puffer, 10-fach	80 ml
ad	1 l ddH ₂ O

TBS, pH 7,6; 10-fach:

NaCl	80	g
Tris-HCl	31,5	g
ad	1	l ddH ₂ O

Das Einstellen des pHs erfolgte mit Hilfe von NaOH.

TBS-T:

TBS, pH 7,6; 10-fach	100	ml
Tween® 20	1	ml
ad	1	l ddH ₂ O

Blockierlösung:

Magermilchpulver	5	g
ad	100	ml TBS-T

Die Lagerung der Blockierlösung erfolgte bei 4°C.

2.1.4.1.4 Antikörperlösung

BSA-TBS-T:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
ad	0,5	l TBS

Die Antikörperlösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.1.4.1.5 Antikörper

Nachfolgend sind die für diese Arbeit verwendeten Antikörper mit Spezies, aus denen sie gewonnen wurden, und Bezugsfirma aufgeführt. Die primären Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in Antikörperlösung verdünnt, die sekundären Antikörper in einem Verhältnis von 1:5000 in Blockierlösung.

Antikörper	Spezies	Firma
Anti-CMKLR1	Kaninchen	Abcam
Anti-Chemerin	Ziege	R&D Systems

Anti-GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
------------	-----------	-----------------------------

Tabelle 1: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper.

Antikörper	Spezies	Firma
Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege HRP-konjugierter AK	Kaninchen	Jackson Immuno Research

Tabelle 2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.

2.1.4.1.6 Lösungen für ELISA

Waschpuffer:

Tween® 20	0,5	ml
ad	1	l PBS

Reagent Diluent:

BSA	5 g
ad	0,5 l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Substratlösung:

Es wurde das Substrat Reagent Pack von R&D Systems verwendet. Dieses enthält zwei Lösungen (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin), die in einem Verhältnis von 1:1 gemischt wurden.

Stopplösung:

Schwefelsäure (rauchend)	5,70	ml
ad	50	ml ddH ₂ O

Verdünnung des Standards, der Antikörper und des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Der entsprechende Standard, der Detection Antibody und das HRP-Streptavidin-Konjugat wurden den Angaben des Herstellers folgend in Reagent Diluent verdünnt. Der Capture Antibody wurde in PBS verdünnt.

Verdünnung der Proben:

Die Proben wurden den Angaben des Herstellers folgend in Reagent Diluent verdünnt.

2.1.4.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA

75%iges Ethanol:

Ethanol	7,50 ml
Nukleasefreies Wasser	2,50 ml

2.1.5 Kit-Systeme

Nachfolgend sind alle verwendeten Kit-Systeme und deren Bezugsfirmen aufgeführt.

Kit-System	Firma
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Duo Set® ELISA Development System human Chemerin	R&D Systems
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Reverse Transcription System	Promega

Tabelle 3: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme.

2.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Ihre Spezifität wurde durch Sequenzierung des amplifizierten DNA-Abschnitts durch die Firma GeneArt AG (Regensburg) sichergestellt.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
CMKLR1_uni	ACC TGC ATG GGA AAA TAT CCT
CMKLR1_rev	GAG GTT GAG TGT GTG GTA GGG
18S rRNA_uni	GAT TGA TAG CTC TTT CTC GAT TCC
18S rRNA_rev	CAT CTA AGG GCA TCA CAG ACC

Tabelle 4: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

2.1.7 Zellen

Die verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Zellart	Beschreibung	Bezugsquelle
LX-2-Zelllinie	Zelllinie humaner Sternzellen	Merck
Primäre humane Sternzellen	Isoliert aus den Überständen primärer humaner Hepatozyten	Hepacult

Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen.

2.1.8 Wachstums- und Stimulationsmedien

Für die primären humanen Sternzellen wurde DMEM mit 4,5 g/l Glukose (Biochrom, Katalognummer: FG 0435), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin, als Wachstumsmedium verwendet. Für die Stimulationen wurde DMEM mit 4,5 g/l Glukose (Biochrom, Katalognummer: FG 0435), versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin, verwendet.

Für Zellen der LX-2-Zelllinie wurde DMEM mit 4,5 g/l Glukose (Merck, Katalognummer: SLM-021-B), versetzt mit 2% FBS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, als Wachstumsmedium verwendet. Für die Stimulationen wurde DMEM mit 4,5 g/l Glukose (Merck, Katalognummer: SLM-021-B), versetzt mit 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, verwendet.

Eine Ausnahme bildeten sowohl bei den primären humanen Sternzellen als auch bei den LX-2-Zellen Stimulationen mit LPS. Hier wurde zum Stimulieren das jeweilige Wachstumsmedium verwendet.

2.1.9 Stimulanzen

Aufgeführt sind die Zytokine und Lipopolysacharid, mit denen im Rahmen dieser Arbeit Zellen inkubiert worden sind.

Stimulanz	Bezugsfirma	Katalognummer
IL-6	R&D Systems	206 IL-010/CF
Leptin	R&D Systems	398-LP-01M
LPS	Sigma	L6529-1MG
TGF- β	R&D Systems	240-B-002/CF
TNF- α	R&D Systems	210-TA-005/CF

Tabelle 6: Die in dieser Arbeit für Stimulationsversuche verwendeten Substanzen.

2.1.10 Patientenkollektiv

Das Kollektiv umfasst 118 Leberproben von Patienten, bei denen im Rahmen einer Leberteilresektion eine Probe aus gesundem Lebergewebe entnommen worden ist. Die Gesamt-RNA und die anonymisierten Patientendaten wurden uns von Herrn Prof. Dr. Thomas Weiss zu Verfügung gestellt. Eine nähere Charakterisierung der Kohorte sowie eine ausführliche Tabelle finden sich unter 3.1 im Ergebnisteil. Das schriftliche Einverständnis der Patienten liegt vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Zellen

2.2.1.1 Primäre hepatische Sternzellen

Um eine reine Kultur primärer hepatischer Sternzellen (HSCs) zu erhalten, mussten diese aus den Überständen humaner Hepatozyten isoliert werden. Die Überstände stammten von der Firma Hepacult. Im ersten Schritt wurden die Überstände auf 50 ml Schraubröhrchen aufgeteilt und bei 700facher Erdbeschleunigung für 7 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml DMEM, versetzt mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin, resuspendiert. Hierbei wurden die Suspensionen von zwei Schraubröhrchen zusammen genommen. Nach Überführen in eine Zellkulturflasche wurde der Überstand nach einer Stunde abgesaugt und 12 ml DMEM (+ 10% FBS, + 1% Penicillin/Streptomycin) wurden hinzugegeben. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die HSCs bereits am Boden der Zellkulturflasche abgesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und dabei die Flaschen stark geklopft und der Flaschenboden mit der Stripette kräftig gespült, um alle anderen Zellen neben den sehr fest sitzenden Sternzellen zu entfernen. Die ersten vier Tage erfolgte ein täglicher Mediumswechsel. Nach ein- bis zweimaligem Passagieren erhielt man eine reine Kultur von HSCs. Das Kultivieren der HSCs erfolgte in 175 cm²-Zellkulturflaschen.

2.2.1.2 LX-2 humane hepatische Sternzelllinie

Die Zellen der LX-2-Zelllinie stammen von der Firma Merck Millipore. Bei diesen Zellen handelt es sich um immortalisierte humane hepatische Sternzellen [43]. Die Kultivierung der LX-2-Zellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen.

2.2.1.3 Zellen auftauen

Sowohl die HSCs als auch die LX-2 humanen hepatischen Sternzellen wurden in Kryoröhrchen bei -80°C aufbewahrt und musste aufgetaut werden. Hierzu wurde die gefrorene Zellsuspension schonend mit Hilfe einer 1250 µl Pipette in 10 ml 37°C warmem DMEM, versetzt mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin, aufgenommen. Nach Zentrifugieren bei 1200 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml 37°C warmem DMEM (+ 10% FBS, + 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Diese Suspension wurde in eine geeignete Kulturflasche überführt und die notwendige Menge an Nährmedium noch ergänzt.

2.2.1.4 Zellkultivierung

Um die Bedingungen für ein optimales Zellwachstum zu schaffen, wurden diese in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Waren die Zellen mehr als 80% konfluent, wurden sie passagiert. Für die Zusammensetzung der Nährmedien der HSCs und der LX-2 Zelllinie siehe Abschnitt „2.1.8 Wachstums- und Stimulationsmedien“. Beide Medien enthielten Penicillin/Streptomycin, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden, und FBS, das eine Vielzahl für das Zellwachstum notwendiger Proteine enthält.

2.2.1.5 Zellpassagierung

Nach Abnahme des Nährmediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin, einer Protease, bei 37°C inkubiert. Hierbei wurden für eine Zellkulturflasche mit HSCs 9 ml Trypsin verwendet und die Flasche wurde für 10 Minuten inkubiert. Für eine Zellkulturflasche mit LX-2-Zellen wurden 3 ml Trypsin verwendet und die Inkubationszeit betrug 5 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch kräftiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst und das Trypsin durch Zugabe von Nährmedium abgestoppt (21 ml Medium bei den HSCs, 7 ml bei den LX-2-Zellen). Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein Schraubröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf frische Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.2.1.6 Zellzählung

Die Zellen wurden im Rahmen der Zellpassagierung gezählt. Die Zellzählung erfolgte nachdem das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen worden war und bevor die

Zellsuspension auf frische Kulturflaschen aufgeteilt wurde. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und so die Konzentration an Zellen ermittelt. Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um eine 5 mm dicke Glasplatte, die einem Objektträger ähnelt. Auf der Oberfläche befinden sich eingeschlifene Quadranten und nach Auflegen des Deckglases ergibt sich zwischen diesen und der Oberfläche der Glasplatte ein definierter Zwischenraum, in den 10 µl der auszuzählenden Zellsuspension pipettiert werden. Es werden 16 der Kleinquadrate ausgezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten, muss die gezählte Zahl an Zellen mit dem Faktor 10.000 multipliziert werden.

2.2.1.7 Zellstimulation

Für die Stimulationsversuche wurden HSCs oder LX-2-Zellen in 6-Well Platten beziehungsweise 12-Well Platten ausgesät. Die Zellzahl pro Well betrug bei einer 6-Well Platte 1 Millionen Zellen, bei einer 12-Well Platte 500.000 Zellen. Den Zellen wurde 24 Stunden Zeit gegeben, sich am Boden des Wells festzusetzen. Bei allen Stimulationen, außer bei denen mit LPS, wurden die Zellen vor der Stimulation mit dem entsprechenden Stimulationsmedium für 24 Stunden ohne Serum kultiviert. Bei Stimulationen mit LPS wurde Serum zugesetzt, da hier wichtige Faktoren für dessen biologische Wirkung enthalten sind. Die Stimulation erfolgte immer für 24 Stunden bei 37°C. Das Stimulanz wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und in entsprechender Menge dem Stimulationsmedium zugegeben. Bei jeder Stimulation wurde in mindestens einem Well eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Die genannten Zellen wurden mit IL-6, Leptin, LPS, TNF- α und TGF- β stimuliert. Bevor die Zellen nach der Stimulation geerntet wurden, wurde das Medium, das die Zellen bedeckt, abgenommen. Mit diesen Überständen wurde im Anschluss ein LDH-Assay durchgeführt und sie wurden bei -20°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

Stimulanz:	Stimulationskonzentrationen: (nach [26, 39])
IL-6 (gelöst in PBS)	5 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml;
Leptin (gelöst in 20 mM Tris-HCl pH 8,0)	4 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml;
LPS (gelöst in ddH ₂ O)	1 µg/ml; 10 µg/ml;
TNF- α (gelöst in PBS)	0,5 ng/ml; 2 ng/ml; 4 ng/ml;
TGF- β (gelöst in 4 mM HCl mit 0,1% BSA)	5 ng/ml; 7 ng/ml; 10 ng/ml;

Tabelle 7: Die in dieser Arbeit für Stimulationsversuche verwendeten Lösungsmittel und Konzentrationen der Substanzen.

2.2.1.8 Laktat-Dehydrogenase Zytotoxizitäts-Assay

Zytotoxizitäts-Nachweise dienen dazu, den toxischen Effekt von Substanzen auf Zellen zu untersuchen. Bei dem Laktat-Dehydrogenase Zytotoxizitäts-Assay (LDH-Assay) wird hierzu das Enzym Laktat-Dehydrogenase gemessen, da dieses in vitalen Zellen nur im Zytoplasma vorkommt. Kommt es zu einer Zellschädigung, geht dies mit einem Integritätsverlust der Zellmembran einher und Laktat-Dehydrogenase wird freigesetzt. Die freigesetzte Laktat-Dehydrogenase reduziert zugegebenes Tetrazoliumsalz zu Formazan. Dessen Konzentration kann photometrisch bei 490 nm gemessen werden, da das Extinktionsmaximum von Formazan bei 492 nm liegt. Auf diese Weise kann auf die LDH-Konzentration zurückgeschlossen werden.

Der Assay wurde in einer 96-Well Platte durchgeführt. Die Nährmediums-Überstände der Zellstimulationen wurden zuvor für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet, bestehend aus Zellen beziehungsweise Zelltrümmern, wurde verworfen. Es wurden pro Well zu 50 µl zellfreiem Überstand 50 µl des entsprechenden Stimulationsmediums und 100 µl Reaktionsgemisch des Kits hinzupipettiert. Es wurden Doppelwerte angefertigt. Der Blank bestand aus 100 µl Stimulationsmedium und 100 µl Reaktionsgemisch. Nach Hinzugabe des Reaktionsgemischs wurde die Extinktion nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur gemessen.

2.2.1.9 Zellen einfrieren

Zellen wurden in entsprechendem Nährmedium, versetzt mit 40% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), bei -80°C für spätere Experimente eingefroren. Hierbei wurde eine Anzahl von circa 2 Millionen Zellen pro Kryoröhrchen aliquotiert. Um ein langsames Einfrieren der Proben zu erreichen, wurde ein Mr. Frosty Freezing Container verwendet.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine Abwandlung der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*), die DNA in Echtzeit quantifiziert. Ermöglicht wird dies durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit), der ausschließlich in doppelsträngige DNA interkaliert. Mit jedem Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion und der damit verbundenen Zunahme an DNA steigt proportional auch die Fluoreszenz. Das für die Reaktion nötige Reaktionsgemisch wurde zusammen mit der zu analysierenden DNA-Probe in eine dünne Glaskapillare pipettiert.

Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

ddH ₂ O	11,6 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl
universe Primer (5 pmol/µl)	1 µl
reverse Primer (5 pmol/µl)	1 µl
LightCycler-Mix (Roche)	2 µl
cDNA	2 µl

Der LightCycler-Mix der Firma Roche enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, Reaktionspuffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und die HotStart Taq-Polymerase. Ein Zyklus der PCR besteht aus den drei Phasen Denaturierung (95°C, 15 s), Annealing (62°C, 10 s) und Elongation (72°C, 10 s). Die Messung der Fluoreszenz erfolgt bei jedem Zyklus nach der Elongationsphase bei 512 nm und einer für das jeweilige DNA-Produkt geeigneten Temperatur. Dadurch wird verhindert, dass auch die Fluoreszenz von Primer-Dimeren gemessen wird, da diese bei einer höheren Temperatur nicht mehr als Doppelstrang vorliegen. Entscheidend für die Quantifizierung der DNA sind die *crossing point* (cp) Werte. An Hand dieser und einer Standardkurve kann die Menge an gebildeter DNA als ein Zahlenwert angegeben werden. Je nach Gen ist eine bestimmte Anzahl an Zyklen notwendig. Dieser Abfolge von Zyklen geht die Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase mit 10 min bei 95°C voraus. Im Anschluss an die Zyklen erfolgt ein Aufschmelzen der entstandenen DNA-Fragmente. Dies geschieht durch langsames Erhöhen der Temperatur von 60°C auf 95°C unter ständigem Messen der Fluoreszenz. Wurde nur der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfältigt, so kann bei einer spezifischen Temperatur ein schlagartiger Abfall der Fluoreszenz beobachtet werden. Die doppelsträngige DNA wurde aufgeschmolzen und der Farbstoffe SYBR® Green I kann sich nicht mehr in diese einlagern. Die Schmelzkurve ist die Qualitätskontrolle der Real-Time PCR. Neben dem Zielgen muss noch ein sogenanntes *housekeeping* Gen untersucht werden, das in den verschiedenen Proben nicht reguliert und somit nicht in signifikant unterschiedlicher Menge vorhanden ist. Die ermittelten Zahlenwerte je Zielgenprobe können nun auf diesen *housekeeper* normalisiert und die daraus resultierenden Werte miteinander verglichen werden.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte spektralphotometrisch. So besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Messung erfolgte neben dieser Wellenlänge auch bei 280 nm, wo sich das Absorptionsmaximum von Proteinen befindet. Um Information über die Reinheit der vorliegenden RNA zu erhalten, wurde der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) und der optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280}) gebildet. Bei reiner RNA liegt dieser bei circa 2. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Hieraus leitet sich die Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration ab:

$$Konz \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = OD_{260} \times 40 \frac{\mu g}{ml} \times Verdünnungsfaktor$$

2.2.3.2 Reverse Transkription

Um die RNA analysieren zu können, beispielsweise mit Hilfe der Real-Time PCR, muss diese in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, welches zu RNA komplementäre, einzelsträngige DNA bildet. Für die Umschreibung wurde das Reverse Transcription System von Promega verwendet. Als Startpunkte für die Reverse Transkriptase dienten Random Hexamer Primers, die sich an die entsprechenden Sequenzen der RNA anlagerten.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sah folgendermaßen aus:

RNA (1 µg) in nukleasefreiem H ₂ O	21,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	8 µl
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
10x RT-Puffer	4 µl
Random Hexamer Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
RNasin Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
Reverse Transkriptase (25 U/µl)	0,5 µl

Der beschriebene Ansatz wurde eine Stunde bei 42°C inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 95°C abgestoppt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Die RNA-Proben aus den Lebergeweben der Patienten wurden alle gleichzeitig in cDNA umgeschrieben, um möglichst identische Bedingungen zu gewährleisten.

2.2.4 Arbeiten mit Protein

2.2.4.1 Proteinisolierung aus Zellen

Die Proteinisolierung erfolgte mit RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*), versetzt mit einem Mix aus Protease- und Phosphataseinhibitoren. Der RIPA-Puffer dient dabei der Lyse der Zellen, indem er die Detergenzien Natriumdodecylsulfat und Natriumdeoxycholat enthält.

Aus dem Well der 6- oder 12-Well Platte wurden die Zellen nach Abnahme des Nährmediums mit Hilfe von PBS und einem Zellschaber gelöst. Um die Zellen zu sammeln, wurde die Suspension für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C und für eine Minute bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend in 50 µl RIPA, versetzt mit Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail, gelöst. Um die genomische DNA zu scheren, wurden die Proben einmal für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Durch Zentrifugieren bei 4000 rpm für die Dauer von 5 Minuten sammelten sich die Zelltrümmer in einem Pellet. Der Überstand mit Protein wurde abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines Bicinchoninsäure (BCA)-Assays. Bicinchoninsäure bildet mit einwertigen Kupferionen eine Komplexverbindung violetter Farbe. Bei dem BCA-Assay reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit den Proteinen der Probe zu einwertigen Ionen. Diese bilden nun mit Bicinchonin eine Komplexverbindung, deren Absorption bei 540 nm gemessen wird. Mit Hilfe von Standardproben bekannter Konzentrationen kann eine Standardkurve erstellt werden.

Es wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce verwendet. Der BCA-Assay wurde in einer 96-Well Platte pipettiert. Die Proben wurden zuvor in PBS 1:10 verdünnt und es wurden Dreifachwerte zu je 10 µl angefertigt. Nach Zugabe von 200 µl der Mischung aus Kupfer(II)sulfat und Bicinchoninsäure wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 540 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der Absorption und der Standardkurve errechnet.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um ein von Ulrich Laemmli entwickeltes Verfahren zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe. Bei dem Gel, in dem die Auftrennung erfolgt, handelt es sich um ein diskontinuierliches Gel. Der untere Bereich,

das Trenngel, dient zum Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe. Den oberen Gelbereich bildet das sogenannte Sammelgel. In diesem werden die Proteine, bevor sie in das Trenngel eintreten, konzentriert. Das Sammelgel weist aus diesem Grund eine größere Porengröße als das Trenngel auf. Vor jeder Gelelektrophorese wurden die Gele neu hergestellt. Hierzu wurde zuerst das Trenngel zwischen zwei abgedichtete Glasplatten definierten Abstands gegossen. Durch radikalische Polymerisation polymerisierte das Gel innerhalb von circa 10 Minuten aus, so dass das Sammelgel auf das feste Trenngel gegossen werden konnte. Ein Probenkamm wurde in dieses mit eingesetzt. Die Gellösungen bestanden aus Acrylamid, dem eigentlichen Gelbildner, Methylenbisacrylamid, das zur Quervernetzung dient, Wasser und SDS. Um die Polymerisation zu starten, wurden Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter zugesetzt. Waren beide Gelbereiche auspolymerisiert, wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Um eine Auftrennung nach Proteingröße zu erreichen, müssen die Proteinproben vor dem Gellauf speziell vorbereitet werden. SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine und führt zu einer negativen Ladung, die proportional zum Molekulargewicht ist. β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken. Beides ist in dem SDS-Probenpuffer (5xLämmli) enthalten, der zu den Proteinproben hinzupipettiert wurde. Die Proben-Puffer-Mischung wurde für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Dies diente dem Aufbrechen der Tertiär- und Sekundärstruktur und führte zusammen mit den beiden Reagenzien zu einer Linearisierung der Proteine. Erst so ist ein Auftrennen dieser nach Kettenlänge und somit nach Molekülmasse im Gel möglich.

Die vorbereiteten Proben wurden in die Probentaschen des Sammelgels pipettiert. Es wurden 15 μ g Protein pro Tasche eingesetzt. Auf jedem Gel erfolgte parallel die Auftrennung einer Standardprobe, um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde das beladene Gel in SDS-Laufpuffer eingelegt. Die Stromstärke betrug konstant 25 mA für 70 Minuten.

2.2.4.4 Western Blotting (Wet Transfer Verfahren) und immunologischer Nachweis

Ziel des Western Blottings ist es, Proteine auf eine Trägermembran zu übertragen und sie so weiteren Untersuchungen, hier dem immunologischen Nachweis der Proteine, zugänglich zu machen. Die zuvor mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine besitzen durch die Behandlung mit SDS eine negative Ladung und wandern somit in einem elektrischen Feld Richtung Anode. Dies macht man sich zunutze, indem man Gel und Trägermembran nebeneinander senkrecht in ein elektrisches Feld einbringt und die Proteine

aus dem Gel auf die Membran wandern lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Wet Transfer Verfahren verwendet. Bei der Trägermembran handelte es sich um Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen.

Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotting in Methanol und Wet Transfer Puffer, das Polyacrylamid-Gel mit den aufgetrennten Proteinen nur in Wet Transfer Puffer äquilibriert. Diese bildeten zusammen mit Whatman-Papieren und zwei Vlies die Bestandteile des sogenannten „Sandwiches“, dessen Aufbau in Abbildung 3 gezeigt ist. Der gezeigte „Sandwich“ wurde in die Blotting-Apparatur, gefüllt mit Wet Transfer Puffer, eingebracht. Während des Blottens wurde die Apparatur durch eine Wasserkühlung gekühlt. Die Spannung betrug konstant 80 V für 90 min.

Um Informationen über die aufgetragenen Proteinproben zu erhalten, werden die gewünschten Proteinbanden auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Dabei bindet ein primärer Antikörper spezifisch an ein Protein. Er selbst wird wiederum von einem sekundären Antikörper gebunden, an den ein Reporterenzym gekoppelt ist. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich hierbei um Meerrettichperoxidase (HRP). Diese katalysiert die Reaktion des in dem Entwicklungsreagenz vorhandenen Luminols mit

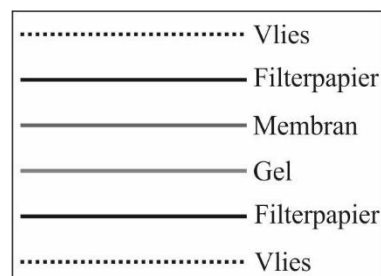


Abbildung 3: Aufbau des „Sandwiches“ bei dem Wet Transfer Verfahren des Western Blottings.

Wasserstoffperoxid, bei der bläuliches Licht ausgesendet wird, das detektiert werden kann.

Um ein unspezifisches Binden des primären Antikörpers zu verhindern, wurde nach dem Blotvorgang die Membran für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert. Nach vier mal 15 Minuten Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei mal 10 Minuten Waschen mit TBS-T wurde sie für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach drei mal 10 Minuten Waschen mit TBS-T und zwei mal 5 Minuten Waschen mit TBS wurde das Entwicklungsreagenz (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent von GE Healthcare) auf die Membran aufgetragen. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des CCD-Kamerasystems des Molecular Imagers ChemiDoc XRS+ (BioRad) gemessen. Die Detektionszeit betrug dabei, je nach Intensität des Signals, zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten.

2.2.4.5 Coomassie Färbung

Im Anschluss an die Immunodetektion der zu untersuchenden Proteine wurden die aus dem Western Blot Verfahren erhaltenen Membranen mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Bei Coomassie Brilliant Blau handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff. Dieser färbt Proteine unspezifisch an, indem er sich an ihre basischen Seitenketten anlagert. Die Nachweisgrenze für das verwendete Coomassie Brilliant Blau G-250 liegt bei 0,5 µg Protein pro Bande. Die Membranen wurde so lange in Coomassie Brilliant Blau inkubiert, bis sich die Banden deutlich abzeichneten. Anschließend wurden sie bis zum gewünschten Färbegrad mit ddH₂O entfärbt, mit Hilfe des Molecular Imagers ChemiDoc XRS+ (BioRad) fotografiert und zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet.

2.2.4.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei dem ELISA handelt sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren mit dem eine Substanz, beispielsweise ein Hormon oder ein Virus, in einer flüssigen Probe (z.B. Serum oder Gelenksflüssigkeit) nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA dazu verwendet, Chemerin in den überständigen Medien ausgesäeter und stimulierter Zellen zu bestimmen. Es wurde hierbei ein Sandwich-ELISA (R&D Duo Set) verwendet.

Der Capture Antibody wurde in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch setzte er sich mit seinem Fc-Teil an der Platte fest. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrere Waschschrte entfernt. Unspezifische Bindungen wurden mittels des Reagent Diluent abgeblockt, das für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubierte. Nach Waschen der Platte wurden der Standard und die Proben aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils Doppelwerte angefertigt. Die Proben sind zuvor 1:16 in Reagent Diluent verdünnt worden. Vorhandenes Antigen in den Proben band nun an den fest sitzenden primären Antikörper. Ein weiterer Waschschrst nach der Inkubation entfernte alle ungebundenen Bestandteile der Probe. Der nun zugegebene Detection Antibody inkubierte ebenfalls 2 Stunden bei Raumtemperatur. Dieser erkannte ebenfalls spezifisch das vorhandene Antigen, band hierbei jedoch an ein anderes Epitop als der primäre Antikörper. An seinem Fc-Teil war er an Biotin gekoppelt. Das nach dem Detection Antibody zugegebene Streptavidin, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, bindet mit hoher Affinität an Biotin. Überschüssiges Streptavidin wurde durch Waschen entfernt. Das Entwicklungsreagenz wurde nach Herstellerangaben gemischt und auf die Platte pipettiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurde die Menge des Farbstoffs photometrisch gemessen und über die Standardkurve konnte die

Proteinkonzentration berechnet werden. Für die statistische Auswertung wurden für jedes der Stimulanzen die Ergebnisse von mindestens drei Stimulationsversuchen vermessen.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Mann-Whitney U Test oder Anova mit Dunnett post-hoc Test in SPSS Statistics 21.0 und mittels Student's t-Test in Microsoft Excel 2010. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ festgesetzt. Die jeweiligen in-vitro Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung hepatischer CMKLR1 mRNA in einem NAFLD-Patientenkollektiv

Wie in der Einleitung unter 1.2.4 bereits ausführlich beschrieben, konnte von Döcke et al. 2013 eine vermehrte CMKLR1 mRNA-Expression in der Leber von NAFLD-Patienten festgestellt werden. Da bei diesen Untersuchungen mit 34 Kontrollpatienten ohne NASH nur 10 Patienten mit einem *NAFLD activity score* (NAS) von 3-4 und nur 3 Patienten mit einem NAS von ≥ 5 eingeschlossen worden waren, ist eine der Zielsetzungen der Arbeit, die CMKLR1-Expression auf mRNA-Ebene in einer größeren Gruppe an NAFLD-Patienten, im Besonderen in einem Kollektiv mit einer größeren Anzahl an Patienten mit einem NAS ≥ 5 , zu untersuchen.

3.1.1 Charakterisierung des Kollektivs

Das hier untersuchte Kollektiv umfasst 118 Leberproben von Patienten, bei denen es auf Grund einer anderen Erkrankung zu einer Teilresektion der Leber kam und von welchen im Rahmen dieser Operation eine Leberprobe aus gesundem Gewebe gewonnen wurde. Die Operationsindikation wurde hierbei auf Grund von Metastasen extrahepatischer Tumore (70 Patienten), fokaler nodulärer Hyperplasie (9 Patienten), Adenom (6 Patienten), Cholangiozellulärem Karzinom (15 Patienten), hepatozellulärem Karzinom (12 Patienten) oder auf Grund einer anderen Erkrankung (6 Patienten) gestellt.

Neben dem Alter und dem Body-Mass-Index (BMI) sind von den meisten Patienten die Serumkonzentrationen der Laborparameter Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP) und der Bilirubin-Wert bekannt. An Nebendiagnosen der Patienten wurde nur das Vorliegen oder die Abwesenheit von Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus Typ 2 und Hypertonie dokumentiert (s. Tabelle 8).

Die Proben wurden nach einem dem *NAFLD activity score* (NAS) angelehnten System beurteilt. Es wurde unabhängig voneinander der Schweregrad der Steatose, der Entzündung und der Fibrose bestimmt. Die Steatose wurde eingeteilt nach: $< 5\%$ Steatose (0), 5-33% Steatose (1), 33-66% Steatose (2) und $> 66\%$ Steatose (3). Die Entzündung wurde eingeteilt nach: kein Herd pro Gesichtsfeld (20-fache Vergrößerung) (0), 0-2 Herde pro Gesichtsfeld (20-fache Vergrößerung) (1), 2-4 Herde pro Gesichtsfeld (20-fache Vergrößerung) (2) und > 4 Herde pro Gesichtsfeld (20-fache Vergrößerung) (3). Die Fibrose nach: keine Fibrose (0), Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose (1), Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose

mit periportaler Fibrose (2), Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose und periportale Fibrose mit brückenbildender Fibrose (3) und Zirrhose (4) [44]. Der Grad jeder Komponente wurde ermittelt. Diese wurden ungewichtet addiert und so zu einem Gesamtscore von 0-9 zusammengefasst. Ein Score größer oder gleich 5 wurde als NASH definiert, ein Score von 1 bis 4 als *borderline* NASH. Alkohol- oder Drogenmissbrauch sowie virale Infektionen wurden anamnestisch als Ursachen der NAFLD ausgeschlossen.

Die Gesamt-RNA wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Thomas Weiss zur Verfügung gestellt.

	Kontrollen	Borderline	NASH	p-Werte
		NASH		
Männl. / Weibl.	16 / 17	22 / 25	24 / 14	
Alter	58 (20-82)	60 (24-84)	66 (33-82)	0,015 [#]
BMI kg/m ²	24.7 (18.3-30.5)	28.0 (22.0-46.0)	28.4 (21.0-57.7)	<0,001 ^{*, #}
ALT U/l	21 (8-50) ³²	35 (17-623) ³⁶	32 (10-984) ³⁵	<0,001 ^{*,#}
AST U/l	23 (8-42) ²⁷	31 (11-688) ³⁵	30 (9-389) ³⁴	0,014 [*] 0,012 [#]
AP U/l	102 (46-203) ²⁹	97 (37-444) ³⁶	91 (45-826) ³⁵	
Bilirubin mg/dl	0.6 (0.19-1.95) ³⁰	0.56 (0.19-1.99) ³⁷	0.53 (0.20-0.53) ³⁶	
Steatose	0 (0-0)	2 (1-2)	2.5 (1-3)	<0,001 ^{*,#,&}
Entzündung	0 (0-0)	0 (0-2)	2 (0-3)	0,005 [*] <0,001 ^{#, &}
Fibrose	0 (0-0)	0 (0-2)	2 (0-4)	0,047 [*] <0,001 ^{#, &}
NAS	0 (0-0)	2 (1-4.5)	6 (5-9)	<0,001 ^{*,#,&}
Typ 2 Diabetes	0	4	11	0,01 [#]
Hypertonie	7	21	17	
Hypercholesterinämie	0	4	10	

Tabelle 8: Die einzelnen Charakteristika und Laborwerte der Kohorte sind als Median angegeben, der Wertebereich in Klammern. Signifikante Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit einem NAS < 5 sind angegeben mit *, zwischen Kontrollen und Patienten mit einem NAS ≥ 5 mit # und zwischen Patienten mit einem NAS < 5 und einem NAS ≥ 5 mit &. Die hochgestellten Zahlen geben die Anzahl der Patienten an, für die der entsprechende Parameter erfasst worden ist, falls er nicht bei allen Patienten vorhanden ist.

3.1.2 CMKLR1 mRNA in der Leber

Um eine Verfälschung späterer Analysen auszuschließen, wurde zuerst untersucht, ob die Operationsindikation einen Einfluss auf die Menge an CMKLR1 mRNA in der Leber hat. Es konnte nachgewiesen werden, dass dem nicht so ist (s. Abbildung 4A). Für die Analyse eines Zusammenhangs zwischen dem Körpergewicht und CMKLR1 wurde das Kollektiv in Patienten mit einem normalen Körpergewicht ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Patienten mit Übergewicht ($\text{BMI} > 25$ und $< 30 \text{ kg/m}^2$) und adipöse Patienten ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) eingeteilt. Es konnte hierbei kein Zusammenhang zwischen den beschriebenen Gruppen und CMKLR1 festgestellt werden (s. Abbildung 4B). Auch war die Expression von CMKLR1 mRNA in den Proben weiblicher und männlicher Patienten gleich (s. Abbildung 4C).

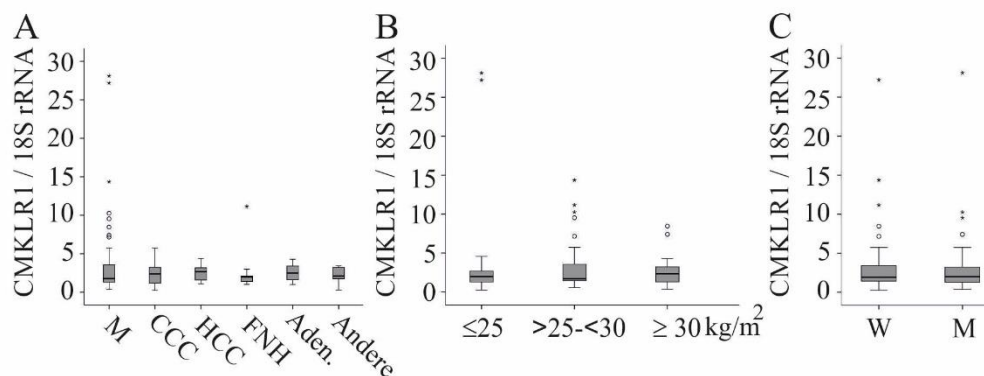


Abbildung 4: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) dargestellt entsprechend der unterschiedlichen Operationsindikationen (M, Metastasen extrahepatischer Tumore; CCC, Cholangiozelluläres Karzinom; HCC, hepatozelluläres Karzinom; FNH, fokale noduläre Hyperplasie; Aden., Adenom) (A), der Kategorien Normalgewicht ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($\text{BMI} > 25$ und $< 30 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (B) und dem Geschlecht (weiblich W, männlich M) (C).

3.1.3 Hepatische CMKLR1 mRNA in der NAFLD

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von CMKLR1 bei Patienten ohne NASH, Patienten mit *borderline* NASH ($\text{NAS} < 5$) und Patienten mit NASH ($\text{NAS} \geq 5$) festgestellt werden (s. Abbildung 5A). Wurden in der Analyse die beiden ersten Gruppen zusammengekommen, konnte ein signifikante Zunahme der Menge an CMKLR1 verglichen mit der Gruppe $\text{NAS} \geq 5$ nachgewiesen werden ($p\text{-Wert} = 0,010$) (s. Abbildung 5B).

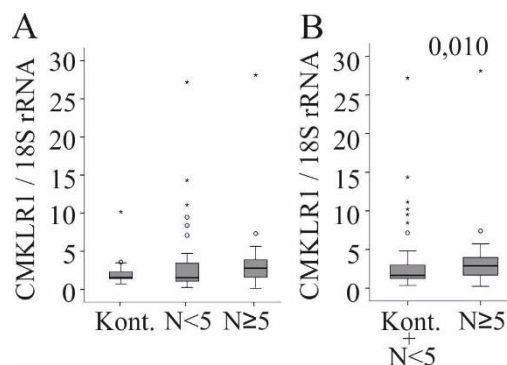


Abbildung 5: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) in den Proben von Patienten mit gesunder Leber (Kont.), Patienten mit borderline NASH ($N < 5$) und Patienten mit NASH ($N \geq 5$) (A); zusammengekommene Kontrollen und borderline NASH-Patienten im Vergleich mit NASH-Patienten (B).

Der NAFLD activity score (NAS) wird anhand der Parameter Steatose, Entzündung und Fibrose der Leber bestimmt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Steatose der Leberproben und der CMKLR1-Expression festgestellt werden. Es bestand jedoch ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen CMKLR1 und der Entzündung (s. Abbildung 6A) und zwischen CMKLR1 und der Fibrose (s. Abbildung 6B). Auch nahm die Menge an CMKLR1 mRNA mit steigendem NASH Score immer weiter zu (s. Abbildung 6C).

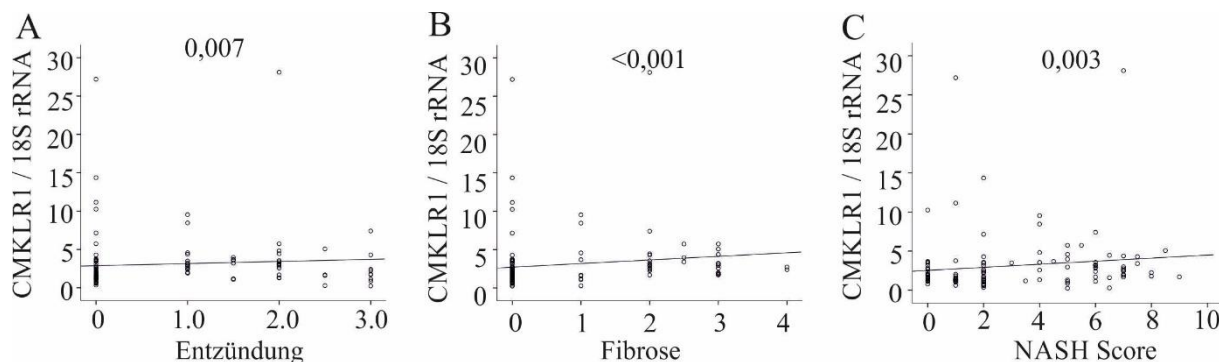


Abbildung 6: Korrelation von CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) mit dem Grad der Entzündung (A), der Fibrose (B) und dem NASH Score (C).

Bei dem Vergleichen der hepatischen CMKLR1-Expression von Patienten ohne Typ 2 Diabetes mit der von Typ 2 Diabetikern in unserem Kollektiv, ergab sich eine signifikant erhöhte Menge an CMKLR1 bei letzteren (p -Wert = 0,01) (s. Abbildung 7A). Da jedoch der Anteil an NASH-Patienten unter den Typ 2 Diabetikern deutlich erhöht ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Zusammenhang verfälscht ist. So lag auch die CMKLR1 mRNA in NASH-Patienten mit oder ohne Typ 2 Diabetes nicht in unterschiedlichen Mengen vor (s. Abbildung 7B).

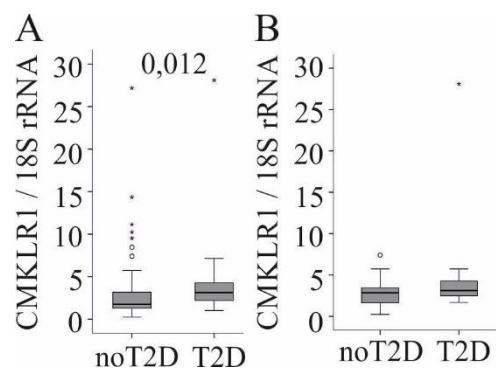


Abbildung 7: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) bei allen Patienten des Kollektivs ohne und mit Typ 2 Diabetes (noT2D / T2D) (**A**); CMKLR1 mRNA bei NASH-Patienten ohne und mit Typ 2 Diabetes (**B**).

Neben Diabetes mellitus Typ 2 ist noch bekannt, ob ein Patient des Kollektivs an Hypertension oder Hypercholesterinämie erkrankt ist (s. Tabelle 8). Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Menge an CMKLR1 mRNA in den Proben von Patienten mit oder ohne Hypertension beziehungsweise Hypercholesterinämie festgestellt werden. Des Weiteren zeigten sich keine Assoziationen zwischen den im Serum gemessenen Werten der ALT, AST, AP, des Bilirubins und der hepatischen CMKLR1 mRNA.

3.1.4 Hepatische CMKLR1 mRNA in weiblichen NAFLD-Patienten

Kukla et al. zeigten, dass es bei weiblichen Patienten mit chronischer Hepatitis C abhängig vom Grad der Fibrose zu einer signifikant unterschiedlichen Expression von CMKLR1 in der Leber kommt [45]. Auf Grund dieser nachgewiesenen geschlechterspezifischen hepatischen Expression von CMKLR1 wurde auch im Rahmen dieser Arbeit im vorliegenden Patientenkollektiv nach Zusammenhängen gesucht, die bei Analyse nur eines der beiden Geschlechter zu Tage treten.

Es zeigte sich kein Unterschied in der Menge an CMKLR1 bei weiblichen Patienten mit einem normalen Körpergewicht ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$) verglichen mit übergewichtigen ($\text{BMI} > 25$ und $< 30 \text{ kg/m}^2$) oder adipösen ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) Patientinnen (s. Abbildung 8A). Auch bei Vergleich der CMKLR1-Expression von Patientinnen mit einer gesunden Leber, einer *borderline* NASH oder einer NASH zeigten sich keine signifikanten Differenzen (s. Abbildung 8B).

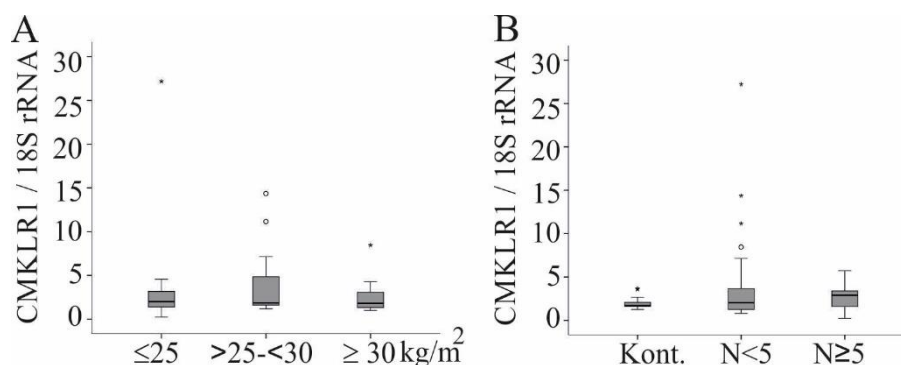


Abbildung 8: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) der weiblichen Patienten der Kohorte dargestellt entsprechend der Kategorien Normalgewicht ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($BMI > 25 \text{ und } < 30 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (A) und nach Patienten mit gesunder Leber (Kont.), borderline NASH ($N < 5$) und NASH ($N \geq 5$) (B).

Es konnte keine Korrelation zwischen CMKLR1 und dem Grad der Fibrose festgestellt werden (s. Abbildung 9A). Ebenso konnten keine Korrelationen zwischen CMKLR1 und dem Grad der Steatose, der Entzündung und dem NASH Score nachgewiesen werden. Patientinnen mit der Nebendiagnose Hypercholesterinämie zeigten erhöhte Werte an hepatischer CMKLR1 mRNA. Da der p-Wert mit 0,065 über dem Signifikanzniveau liegt, stellt dies nur einen Trend dar (s. Abbildung 9B). Bezüglich der Komorbidität Diabetes mellitus Typ 2 konnten keine signifikanten Unterschiede in der CMKLR1 mRNA-Expression festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein schwacher Trend zu erhöhten CMKLR1-Werten bei Typ 2 Diabetikerinnen (p-Wert = 0,113) (s. Abbildung 9C). Des Weiteren ergaben sich keine Assoziationen zwischen den im Serum gemessenen Werten der ALT, AST, AP, des Bilirubins und der hepatischen CMKLR1 mRNA bei weiblichen NALFD-Patienten.

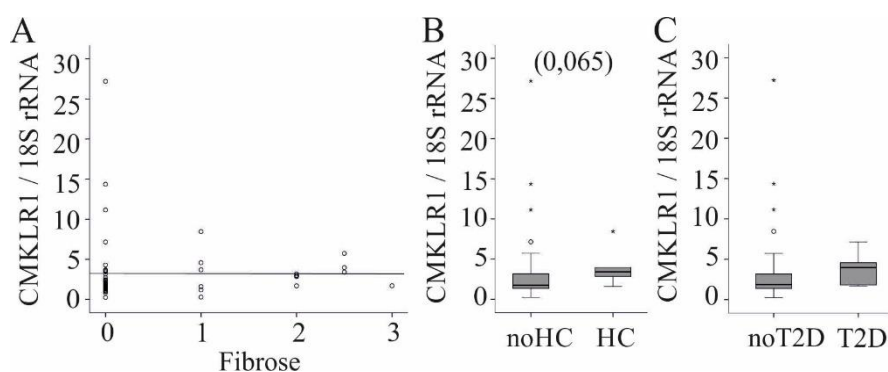


Abbildung 9: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) der weiblichen Patienten der Kohorte: Korrelation mit dem Grad der Fibrose (A); CMKLR1 bei Patientinnen ohne (noHC) und mit (HC) Hypercholesterinämie (B) und ohne (noT2D) und mit (T2D) Typ 2 Diabetes (C).

3.1.5 Hepatische CMKLR1 mRNA in männlichen NAFLD-Patienten

Entsprechend der Analysen der Daten weiblicher Patienten konnte auch bei den männlichen Patienten kein Zusammenhang mit dem BMI nachgewiesen werden (s. Abbildung 10A). Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Menge an CMKLR1 mRNA in den Leberproben von Patienten mit einer gesunden Leber verglichen mit Patienten mit *borderline* NASH oder NASH (s. Abbildung 10B). Wurden die Messergebnisse der CMKLR1 mRNA der beiden ersten Gruppen, Patienten mit einer gesunden Leber und Patienten mit *borderline* NASH, zusammengefasst und mit Patienten mit einer NASH verglichen, ergab sich eine signifikant erhöhte Menge an CMKLR1 in letzteren (p-Wert = 0,003) (s. Abbildung 10C).

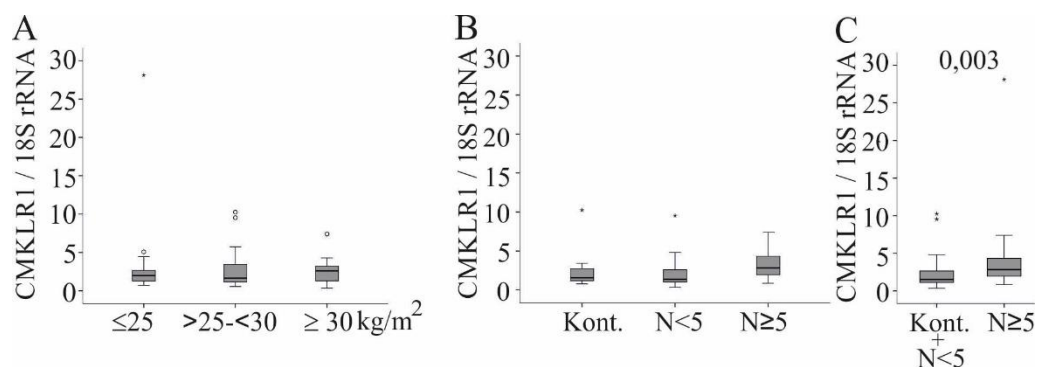


Abbildung 10: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) der männlichen Patienten der Kohorte dargestellt entsprechend der Kategorien Normalgewicht ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($\text{BMI} > 25$ und $< 30 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (A); nach Patienten mit gesunder Leber (Kont.), Patienten mit *borderline* NASH ($N < 5$) und Patienten mit NASH ($N \geq 5$) (B); zusammengefasste Kontrollen und *borderline* NASH-Patienten im Vergleich mit NASH-Patienten (C).

Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen der CMKLR1 mRNA und dem Grad der Entzündung, der Fibrose und dem NASH Score. Hiervon sei die Korrelation mit dem Grad der Fibrose beispielhaft gezeigt (p-Wert $< 0,001$) (s. Abbildung 11A). Auch war die Menge an CMKLR1 mRNA bei männlichen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 tendenziell erhöht (p-Wert = 0,058) (s. Abbildung 11B). Bezüglich der Komorbidität Hypercholesterinämie konnte kein Unterschied der CMKLR1 mRNA bei Patienten mit beziehungsweise ohne dieser Nebendiagnose nachgewiesen werden (s. Abbildung 11C). Des Weiteren zeigten sich keine Assoziationen zwischen den im Serum gemessenen Werten der ALT, AST, AP, des Bilirubins und der hepatischen CMKLR1 mRNA bei männlichen NAFLD-Patienten.

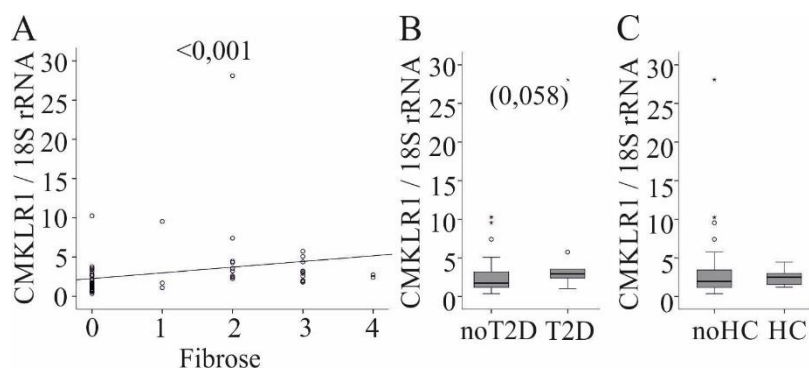


Abbildung 11: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) der männlichen Patienten der Kohorte: Korrelation mit dem Grad der Fibrose (A); CMKLR1 bei Patienten ohne (noT2D) und mit (T2D) Typ 2 Diabetes (B) und ohne (noHC) und mit (HC) Hypercholesterinämie (C).

3.2 Regulation von CMKLR1 Protein durch Zytokine, Leptin und Lipopolysaccharid

Eine erhöhte Menge an CMKLR1 in der Leber von NAFLD-Patienten verglichen mit gesunden Patienten wurde sowohl in dem obig beschriebenen Kollektiv festgestellt als auch in früheren Publikationen einer anderen Arbeitsgruppe bereits beschrieben [38]. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob dies auf eine vermehrte Expression von CMKLR1 in Sternzellen zurückgeführt werden kann. Hierzu wurden humane hepatische Sternzellen und Zellen der humanen hepatischen Sternzellreihe LX-2 mit Faktoren mit einer erwiesenen Rolle in der Pathogenese der NAFLD stimuliert. So wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an IL-6, Leptin, LPS, TGF- β und TNF- α für 24 Stunden inkubiert. Die gewählten Konzentrationen orientieren sich an ähnlichen Stimulationsversuchen mit primären humanen Hepatozyten, die von unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt worden sind [26] + [39].

Nach Extraktion der Proteine aus den Zelllysaten wurden diese mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens analysiert.

Dass sowohl humanen HSCs als auch Zellen der LX-2-Zellreihe den Chemerinrezeptor CMKLR1 exprimieren, ist zum Teil aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (s. Abbildung 12 + [26]).

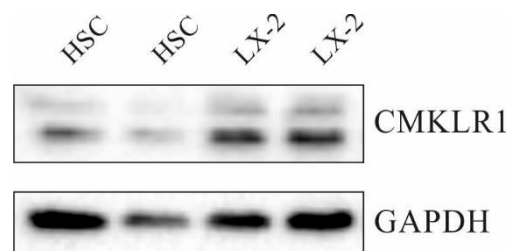


Abbildung 12: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten von unstimulierten HSCs zweier Spender und von LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle

3.2.1 Stimulationsversuche mit IL-6

Bei Stimulation von LX-2-Zellen mit IL-6 in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml zeigte sich keine Veränderung der Expression von CMKLR1 (s. Abbildung 13).

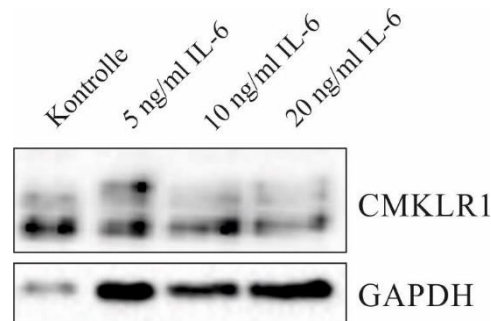


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

3.2.2 Stimulationsversuche mit Leptin

Bei der Stimulation von LX-2-Zellen mit Leptin in den Konzentrationen 4 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml zeigte sich keine Veränderung der Expression von CMKLR1 (s. Abbildung 14).

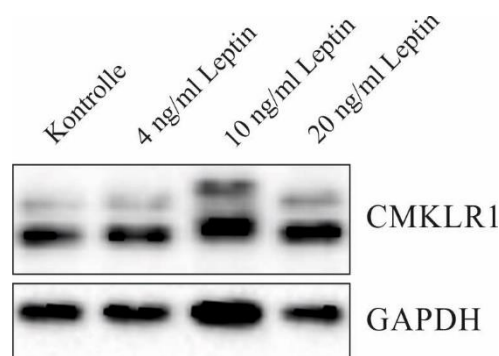


Abbildung 14: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

3.2.3 Stimulationsversuche mit Lipopolysaccharid

Bei der Stimulation von LX-2-Zellen mit LPS in den Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml zeigte sich keine Veränderung der Expression von CMKLR1 (s. Abbildung 15).

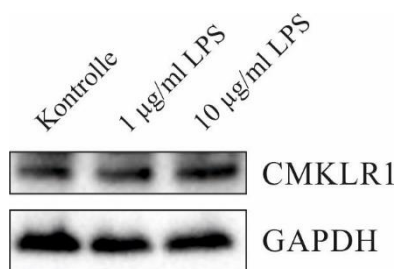


Abbildung 15: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

3.2.4 Stimulationsversuche mit TGF- β

Bei der Stimulation von HSCs mit TGF- β in den Konzentrationen 5 ng/ml, 7 ng/ml und 10 ng/ml zeigte sich keine Veränderung der Expression von CMKLR1 (s. Abbildung 16).

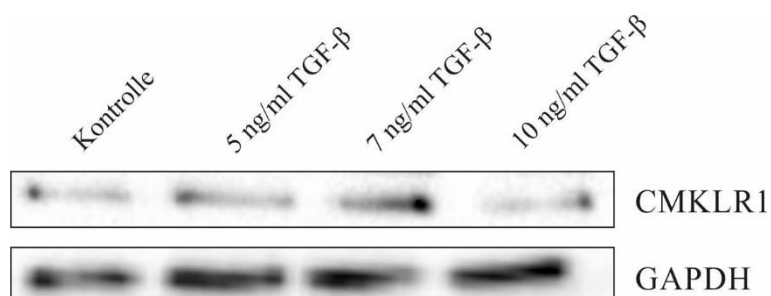


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

3.2.5 Stimulationsversuche mit TNF- α

Bei der Stimulation von HSCs mit TNF- α in den Konzentrationen 0,5 ng/ml, 2 ng/ml und 4 ng/ml zeigte sich keine Veränderung der Expression von CMKLR1 (s. Abbildung 17). Auch bei der gleichartigen Stimulation von LX-2-Zellen konnte keine Veränderung der CMKLR1-Expression festgestellt werden (s. Abbildung 18).

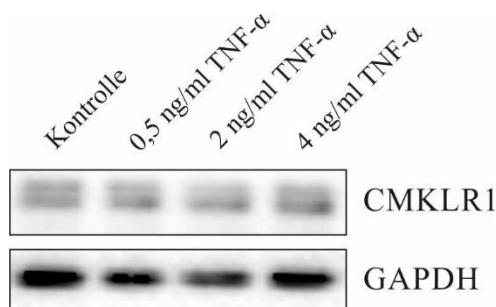


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

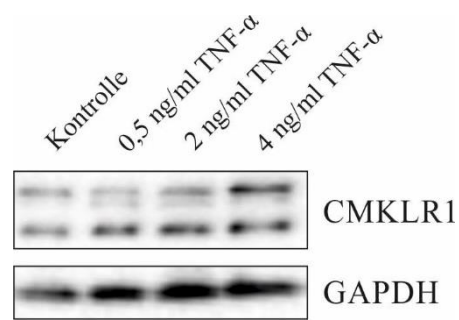


Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von *CMKLR1* in den Zelllysaten stimulierter *LX-2*-Zellen. *GAPDH* dient der Ladungskontrolle.

3.3 Regulation von Chemerin Protein durch Zytokine, Leptin und Lipopolysaccharid

Da in früheren Publikationen nicht nur eine vermehrte Expression von CMKLR1 in Leberproben von NALFD-Patienten beschrieben worden ist, sondern auch eine erhöhte Menge an Chemerin [38], wurde bei den unter 3.2 beschriebenen Stimulationsversuchen auch der Einfluss der genannten Faktoren auf die Expression von Chemerin in HSCs und Zellen der LX-2-Zellreihe untersucht. Hierzu wurden die Zelllysate mit dem Western-Blot-Verfahren analysiert.

Dass sowohl humane HSCs als auch Zellen der LX-2-Zellreihe Chemerin exprimieren, ist zum Teil aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe bekannt und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (s. Abbildung 19 + [39]).

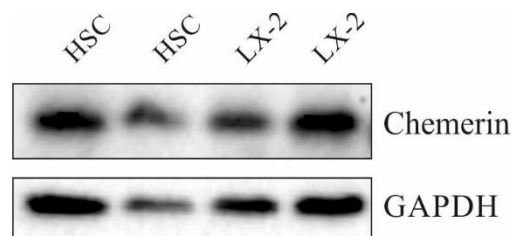


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten von unstimulierten HSCs zweier Spender und von LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

Darüber hinaus wurden die Überstände bei den Versuchen abgenommen und mittels ELISA untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob es bei den Stimulationen zu einer veränderten Sekretion von Chemerin durch die Zellen gekommen ist. Bei der Auswertung der ELISA-Ergebnisse wurden immer die Stimationsversuche eines Stimulanz von einer Zellart zusammengekommen. Um hierbei die gemessenen Chemerin-Konzentrationen vergleichen zu können, wurden diese auf die Proteinkonzentration normalisiert und in Prozent der Chemerin-Konzentration des Überstands der als Kontrolle inkubierten Zellen angegeben. Somit sind auch in den entsprechenden Abbildungen die Chemerin-Konzentrationen der Stimulationen in Prozent der Konzentration der Kontrollen, welche als 100 % festgesetzt wurden, angegeben.

3.3.1 Stimulationsversuche mit IL-6

Bei der Stimulation von LX-2-Zellen mit IL-6 in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml konnte keine Veränderung der Expression von Chemerin festgestellt werden (s. Abbildung 20).

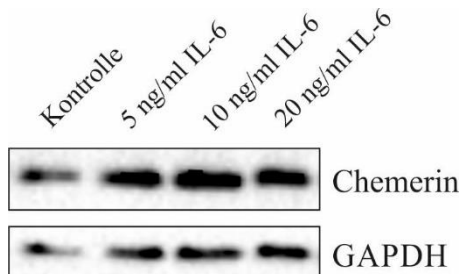


Abbildung 20: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

Auch in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Konzentrationen an Chemerin (s. Abbildung 21).

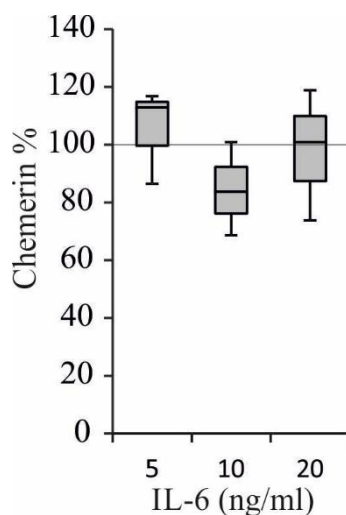


Abbildung 21: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen.

3.3.2 Stimulationsversuche mit Leptin

Bei der Stimulation von LX-2-Zellen mit Leptin in den Konzentrationen 4 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml ergab sich keine veränderte Expression von Chemerin in den Zelllysaten (s. Abbildung 22). Auch in den Überständen konnte keine signifikante Veränderung der Chemerin-Konzentration nachgewiesen werden (s. Abbildung 23).

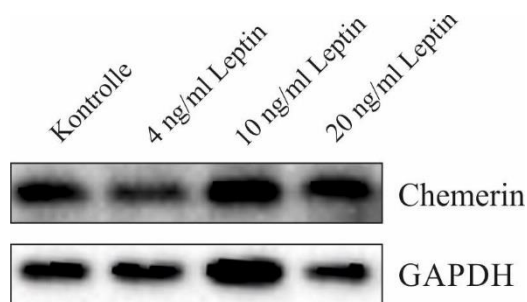


Abbildung 22: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

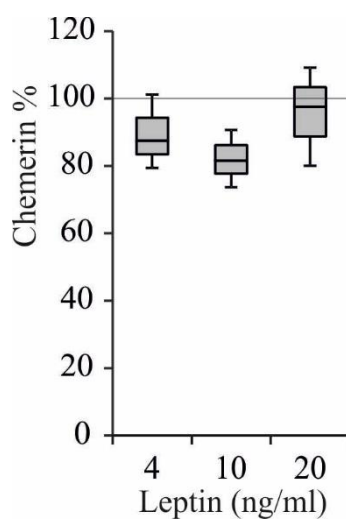


Abbildung 23: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen.

3.3.3 Stimulationsversuche mit Lipopolysaccharid

Bei den Stimulationsversuchen von LX-2-Zellen mit LPS in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich in den Western-Blots keine veränderte Expression von Chemerin (s. Abbildung 24). Die Chemerin-Konzentrationen in den Überständen der Stimulationen zeigten eine signifikante Abnahme der Chemerin-Konzentration bei Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, verglichen mit den Werten der zur Kontrolle inkubierten Zellen (p-Wert = 0,04) (s. Abbildung 25).

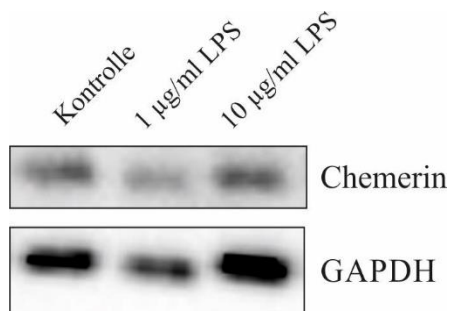


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

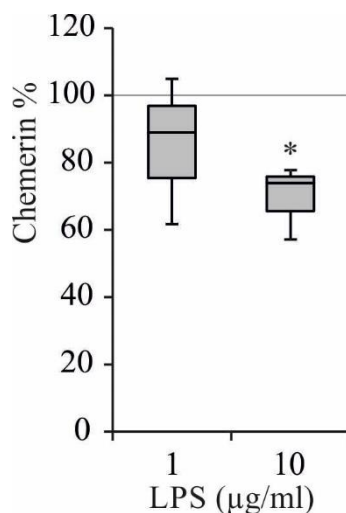


Abbildung 25: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen. * zeigt einen p -Wert $< 0,05$, verglichen mit den Kontrollen, an.

3.3.4 Stimulationsversuche mit TGF- β

Bei Stimulation von HSCs mit TGF- β in den Konzentrationen 5 ng/ml, 7 ng/ml und 10 ng/ml konnte keine Veränderung der Expression von Chemerin in den Zelllysaten festgestellt werden (s. Abbildung 26). Auch bei Stimulation von LX-2-Zellen mit TGF- β in der Konzentration 7 ng/ml zeigte sich kein Unterschied in der Menge an Chemerin-Protein (s. Abbildung 27).

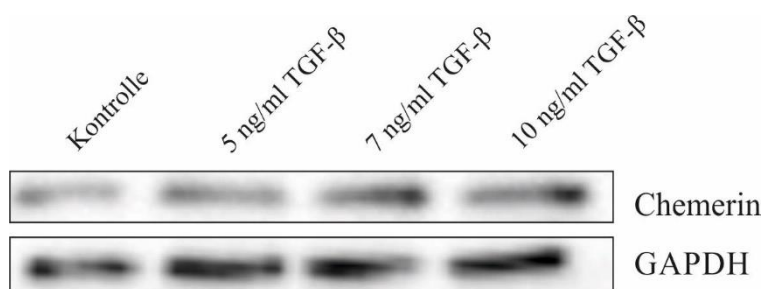


Abbildung 26: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

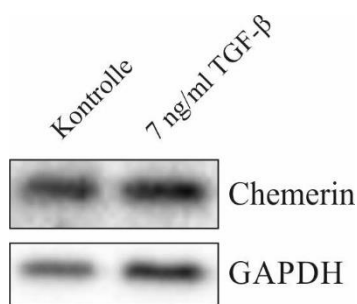


Abbildung 27: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

Bei Analyse der Chemerin-Konzentration in den Überständen der stimulierten LX-2-Zellen wurde eine Tendenz bei Stimulation mit 7 ng/ml TGF- β gegenüber den zur Kontrolle inkubierten Zellen deutlich (p-Wert = 0,05) (s. Abbildung 28).

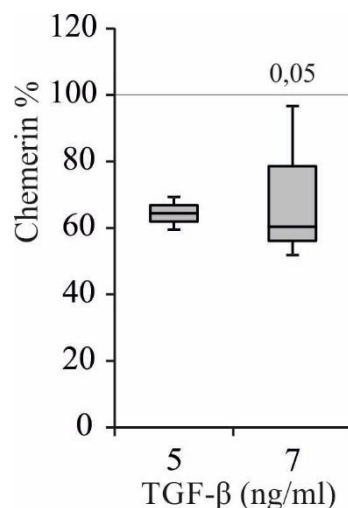


Abbildung 28: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen.

3.3.5 Stimulationsversuche mit TNF- α

Bei Stimulation von HSCs mit TNF- α in den Konzentrationen 0,5 ng/ml, 2 ng/ml und 4 ng/ml zeigte sich keine Veränderung der Chemerin-Expression in den Zelllysaten (s. Abbildung 29). Auch bei Stimulationsversuchen mit LX-2-Zellen mit denselben Konzentrationen an TNF- α ergaben sich keine Unterschiede in der Menge an Chemerin-Protein (s. Abbildung 30).

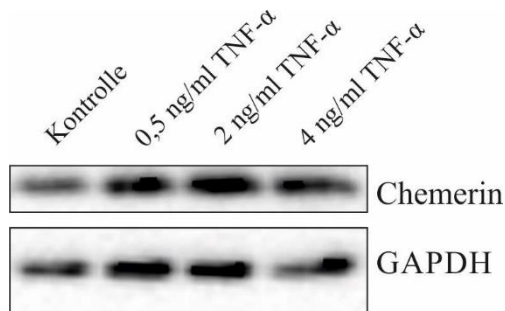


Abbildung 29: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

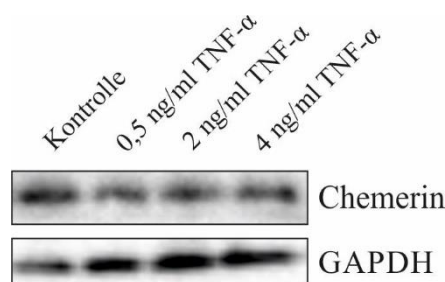


Abbildung 30: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.

Bei der Analyse der Chemerin-Konzentrationen in den Überständen stimulierter HSCs konnte eine signifikante Verringerung bei Stimulation mit TNF- α in der Konzentration 0,5 ng/ml gegenüber den zur Kontrolle inkubierten Zellen festgestellt werden (p-Wert = 0,01). Bei Stimulation mit TNF- α -Konzentrationen von 2 und 4 ng/ml kam es auch zu erniedrigten Chemerin-Konzentrationen in den Überständen, wobei diese jedoch gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verschieden sind (s. Abbildung 31).

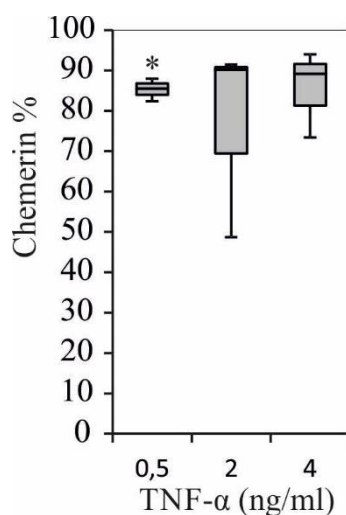


Abbildung 31: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter HSCs. * zeigt einen p-Wert < 0,05, verglichen mit den Kontrollen, an.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung hepatischer CMKLR1 mRNA in einem NAFLD-Patientenkollektiv

In dem hier untersuchten NAFLD-Patientenkollektiv konnte gezeigt werden, dass die CMKLR1 mRNA nur bei männlichen NAFLD-Patienten mit den in den NAS einfließenden Faktoren Entzündung und Fibrose und folglich auch mit dem NAS positiv korreliert. Bei der Analyse der Daten der weiblichen Patienten konnte kein Zusammenhang zwischen der hepatischen CMKLR1 mRNA und der NAFLD festgestellt werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Döcke et al. 2013 publizierten Daten. Bei den von dieser Gruppe untersuchten Patienten konnte ebenso eine erhöhte CMKLR1 mRNA-Expression in der Leber von NASH-Patienten festgestellt werden [38]. Es ist jedoch keine geschlechterspezifische Berechnung durchgeführt worden. So könnte es sein, dass in dem von Döcke et al. untersuchten Kollektiv die CMKLR1-Erhöhung nur bei den männlichen NASH-Patienten auftrat. Die mögliche Bedeutung der unterschiedlichen Expression von CMKLR1 in den beiden Geschlechtern wird in folgendem Abschnitt diskutiert.

Zum einen ist bekannt, dass die NAFLD und die NASH eine höhere Prävalenz unter Männern als unter Frauen haben [46]. Eine schlüssige Erklärung, wieso dem so ist, gibt es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht. Eine diskutierte Theorie ist, dass ein moderater Alkoholkonsum, d.h. ein Konsum in Mengen, die keine Alkoholische Steatohepatitis bedingen, sich bei den beiden Geschlechtern unterschiedlich auf den Leberstoffwechsel auswirkt. So scheint ein gemäßigter Konsum bei Frauen, zu einer niedrigeren Prävalenz der NAFLD zu führen. Bei Männern hingegen war die Prävalenz der NAFLD bei moderatem Alkoholkonsum erhöht [47]. Eine andere Theorie geht davon aus, dass die Ursache bei den unterschiedlichen Geschlechtshormonen liegt. So zeigte sich in einer Studie, dass die Prävalenz der NAFLD bei prä- und intrapubertären Jungen gleich, bei postpubertären Jungen jedoch erhöht ist. In der Pubertät kommt es zu einem Anstieg der Produktion der Geschlechtshormone. Bei den Mädchen dieser Untersuchung war die Prävalenz bei den postpubertären Mädchen im Vergleich mit den intrapubertären vermindert [46]. Mit CMKLR1 könnte ein weiterer Faktor identifiziert worden sein, der zur erhöhten Prävalenz der NAFLD bei Männern beiträgt.

Des Weiteren könnte die erhöhte Menge an CMKLR1 mRNA in den Leberproben männlicher NASH-Patienten darauf hindeuten, dass es hier zu einer verstärkten Aktivierung des Rezeptors durch Chemerin kommt. So konnte bei der Untersuchung von Patienten mit

chronischer Hepatitis C festgestellt werden, dass es bei weiblichen Patienten einen negativen Zusammenhang zwischen dem BMI und der hepatischen Chemerin-Expression gibt. Bei den männlichen Patienten zeigte sich ein solcher Zusammenhang nicht [45]. Da in dem hier untersuchten Kollektiv der BMI in der Gruppe der NASH-Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant erhöht war, könnte man basierend auf der erwähnten Publikation davon ausgehen, dass bei den weiblichen NASH-Patienten die Chemerin-Expression geringer ist als bei den männlichen NASH-Patienten. Auf mRNA-Ebene zeigte sich jedoch bei Pohl et al. kein Unterschied in der Chemerin-Expression zwischen den beiden Geschlechtern in dem hier untersuchten Kollektiv [41].

Chemerin wird als inaktives Prochemerin sezerniert. Durch proteolytische Spaltung am C-Terminus entstehen verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher Affinität zu CMKLR1 [22]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Chemerin, welches durch Cystein-Proteasen prozessiert wurde, eine anti-inflammatorische Wirkung über CMKLR1 entfaltet. Durch Serin-Proteasen verändertes Chemerin hingegen zeigte eine pro-inflammatorische Wirkung durch Aktivierung von CMKLR1 [25]. Über eine unterschiedliche Prozessierung von Chemerin in den verschiedenen Geschlechtern ist noch nichts bekannt. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um diesen komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Bereich der Prozessierung und des *signalings* von Chemerin näher zu beleuchten.

Beim Betrachten der Zusammenhänge zwischen CMKLR1 mRNA und der Komorbidität Diabetes mellitus Typ 2 in der gesamten Kohorte, war CMKLR1 signifikant bei Typ 2 Diabetikern erhöht. Auch bei der Analyse der einzelnen Geschlechter zeigte sich in beiden ein Trend zu erhöhten CMKLR1-Werten bei Typ 2 Diabetikern. Die Aussagekraft dieser Untersuchungen ist dadurch deutlich limitiert, dass keiner der Kontrollpatienten mit einer gesunden Leber Typ 2 Diabetes hat und auch in der Gruppe mit *borderline* NASH sich nur vier Typ 2 Diabetiker befinden. Der größte Anteil befindet sich mit 11 Patienten in der Gruppe mit NASH. Da CMKLR1 bei NASH-Patienten erhöht ist, könnte es sein, dass die erhöhten CMKLR1-Werte bei Typ 2 Diabetikern nicht mit dieser Erkrankung zusammenhängen, sondern nur an dem hohen Anteil an NASH-Patienten in dieser Gruppe liegen. Diese Vermutung wird durch die gleich ausgeprägte CMKLR1-Expression bei NASH-Patienten mit und ohne Typ 2 Diabetes untermauert. Auf Grund der obig beschriebenen Verteilung der Patienten mit Typ 2 Diabetes über die verschiedenen Gruppen des Kollektivs (Kontrollen, *borderline* NASH, NASH) könnte natürlich auch der Zusammenhang zwischen CMKLR1 und der NASH verfälscht sein. In dem Sinne, dass CMKLR1 bei der Gruppe der

NASH-Patienten nur wegen der höheren Anzahl an Typ 2 Diabetikern erhöht ist. Diese Überlegungen werden jedoch dadurch widerlegt, dass in der Gruppe der NASH-Patienten mit und ohne Typ 2 Diabetes keine unterschiedliche CMKLR1-Expression nachweisbar ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier präsentierten Daten einen Zusammenhang zwischen CMKLR1 und Diabetes mellitus Typ 2 vermuten lassen, jedoch mit Vorsicht interpretiert werden müssen. Da aber auch andere Daten einen Zusammenhang zwischen CMKLR1 beziehungsweise Chemerin und dem Glukosestoffwechsel andeuten [34], werden weitere Untersuchungen in diese Richtung in Zukunft unerlässlich sein und einen besseren Einblick in die Zusammenhänge von CMKLR1 in der Leber und Typ 2 Diabetes ermöglichen.

Bei der Analyse der Daten weiblicher Patienten des Kollektivs zeigte sich ein Trend zu erhöhten hepatischen CMKLR1 mRNA-Werten bei Frauen mit Hypercholesterinämie. Die Aussagekraft dieses Trends wird durch die mit nur sechs Frauen sehr geringe Anzahl an Patientinnen mit Hypercholesterinämie geschmälert. Darüber hinaus befindet sich keine der sechs Frauen in der Kontrollgruppe. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Blockieren der Cholesterinsynthese keinen Einfluss auf die CMKLR1-Expression in Adipozyten hat [48]. Von Wanninger et al. 2011 wurde beschrieben, dass CMKLR1 in humanen Proben hepatischer Steatose verringert ist. Hier wurde auch gezeigt, dass erhöhtes Cholesterin in Hepatozyten zu keiner veränderten CMKLR1-Expression führt [26]. Diese Daten deuten darauf hin, dass die in diesem Kollektiv gemessene erhöhte CMKLR1-Expression bei Frauen mit Hypercholesterinämie kritisch zu hinterfragen ist. Jedoch kann ein Zusammenhang zwischen CMKLR1 in der Leber und Hypercholesterinämie, unabhängig von der NAFLD, nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung sind weitere Untersuchungen von Patienten mit Hypercholesterinämie und ohne NAFLD notwendig.

In dem hier untersuchten Kollektiv zeigte sich sowohl bei der Analyse der Daten der gesamten Kohorte als auch beim Betrachten von nur weiblichen bzw. nur männlichen Patienten kein Zusammenhang zwischen der hepatischen CMKLR1 mRNA-Expression und dem BMI. Diesen Erkenntnissen widerspricht die von Döcke et al. 2013 beschriebene, signifikante Zunahme von CMKLR1 bei höheren BMI-Werten [38]. Dieser Widerspruch bei Untersuchungen mit humanen Proben spiegelt sich auch in den veröffentlichten Daten zu CMKLR1 und Körpermaßen in Tierversuchen wieder. So wurde gezeigt, dass CMKLR1 *knockout* Mäuse einen schlankeren Phänotyp mit einem geringerem Körpergewicht besitzen [34]. Dem widersprechend wurde auch beschrieben, dass es bei CMKLR1 *knockout* Mäusen zu keinem verändertem Körpergewicht [36] beziehungsweise zu einem erhöhtem

Körpergewicht kommt [35]. Bei dieser nicht eindeutigen Datenlage unterstützen die hier durchgeführten Untersuchungen die Hypothese, dass es keinen Zusammenhang zwischen CMKLR1 und dem Körpergewicht gibt.

Eine Limitierung der hier durchgeführten Untersuchungen an dem NAFLD-Patientenkollektiv besteht darin, dass keine Proteinproben zur Verfügung standen. Besonders da es Hinweise darauf gibt, dass es auf Grund einer bisher nicht untersuchten posttranskriptionellen Regulation zu Unterschieden zwischen der mRNA-Expression und der Proteinexpression von CMKLR1 kommen könnte. So wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass CMKLR1 Protein in der humanen Fettleber vermindert exprimiert wird beziehungsweise dass es keinen Zusammenhang zwischen der CMKLR1 Expression und den Aspekten der NASH, wie zum Beispiel Steatose, Inflammation oder Fibrose, gibt [26] + [49]. Es ergibt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der CMKLR1 mRNA-Expression in der Leber und dem Grad der Verfettung in dem hier untersuchten Kollektiv. Des Weiteren ist CMKLR1 Protein in der Leber von Mäusen unter MCD-Diät, eine Diät, die als Modell für die NASH in Mäusen verwendet wird, stark erniedrigt [26]. Auch dies widerspricht der hier gefunden positiven Assoziation von CMKLR1 mRNA und dem NASH Score. Es bedarf weiterer Untersuchungen um herauszufinden, ob und wenn wie CMKLR1 posttranskriptionell reguliert wird und welche Rolle CMKLR1 in der Pathogenese der NASH spielt.

4.2 Regulation von CMKLR1 Protein durch Zytokine, Leptin und Lipopolysaccharid

Sowohl in dem von Döcke et al. 2013 untersuchten Kollektiv als auch in der hier analysierten Kohorte konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der NASH und der Menge an hepatischer CMKLR1 mRNA festgestellt werden [38]. Grundsätzlich könnten alle Zellen der Leber, welche den Chemerin-Rezeptor CMKLR1 exprimieren, für diese Zunahme verantwortlich sein. Aus diesem Grund ist es interessant, den Einfluss von Zytokinen und Lipopolysaccharid, die eine Rolle in der Pathogenese der NASH spielen, auf die Expression von CMKLR1 in diesen Zellen zu untersuchen. Da die Hepatozyten den mit Abstand größten Anteil aller Zellen in der Leber darstellen, stehen sie natürlicherweise im besonderen Fokus dieser Untersuchungen. Auch die hepatischen Sternzellen, die eine zentrale Rolle im Übergang der NASH zur Leberfibrose spielen, exprimieren CMKLR1 und könnten für die beschriebene Expressionszunahme verantwortlich sein.

Von unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführte Stimulationsversuche mit primären humanen Hepatozyten (PHH) und den Stimulanzen LPS, Leptin und TNF- α zeigten keine Veränderung der Expression von CMKLR1-Protein [26]. Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit HSCs und LX-2-Zellen konnten keine veränderten CMKLR1-Proteinkonzentrationen bei Stimulation mit den genannten Substanzen festgestellt werden.

Döcke et al. 2013 zeigten, dass es bei Stimulation von PHHs mit IL-6 in einer Konzentration von 50 ng/ml zu einer Zunahme der CMKLR1 mRNA kommt [38]. Bei früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit PHHs und IL-6, in Konzentrationen von 5 ng/ml, konnte jedoch keine veränderte CMKLR1-Expression auf Proteinebene festgestellt werden [26]. Auch bei den hier durchgeführten Stimulationen von LX-2-Zellen mit IL-6 in Konzentrationen bis zu 20 ng/ml zeigte sich keine Änderung der Proteinkonzentration von CMKLR1. Eine Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse bei den Stimulationsversuchen mit den PHHs könnte an der deutlich höheren Konzentration von IL-6 liegen, die Döcke et al. verwendet hatten. Eine andere Erklärung wäre, dass es, wie bereits obig diskutiert, zu einer posttranskriptionellen Regulation von CMKLR1 kommt und somit eine Veränderung der CMKLR1 mRNA nicht in einer Änderung der Proteinmenge resultiert. Wenn man eine solche Regulation annehmen würde, könnten die erhöhten Werte an CMKLR1 mRNA in dem hier untersuchten Kollektiv durch eine Stimulation der Hepatozyten mit IL-6 erklärt werden. Gestützt würde diese Theorie dadurch, dass in dem von Döcke et al. untersuchten Kollektiv ein positiver Zusammenhang zwischen der IL-6 mRNA und der CMKLR1 mRNA gefunden worden ist [38]. Jedoch ist hierbei im Hinterkopf zu behalten, dass sich in diesem Kollektiv nur drei Patienten mit einer NASH befanden. Auch wäre es interessant zu klären, ob IL-6 nur in den Lebern von männlichen NASH-Patienten erhöht ist. Die bisher veröffentlichten Studien zeigen lediglich eine vermehrte IL-6-Expression in der NASH, wobei hier keine Aufteilung nach den Geschlechtern erfolgte [50] + [51]. Man könnte auch die CMKLR1 mRNA in LX-2-Zellen oder HSCs nach Stimulation mit IL-6 untersuchen, um festzustellen, ob ein Unterschied zwischen der mRNA und dem Protein vorliegt und ob hier ein Grund für die Zunahme der CMKLR1 mRNA bei NASH-Patienten liegen könnte.

Bei Stimulationsversuchen von PHHs mit TGF- β zeigte sich ein Trend zur Abnahme von CMKLR1 Protein [26]. Dies konnte in den HSCs so nicht nachgewiesen werden. Da in der genannten Arbeit von Wanninger et al. 2011 auch eine Zunahme von CMKLR1 Protein in PHHs bei Stimulation mit Adiponektin festgestellt worden ist, könnte dies die erniedrigte Konzentration von CMKLR1 Protein in humanen Fettleberproben und in Leberproben von

Mäusen unter MCD-Diät erklären [26]. Denn in der NAFLD ist TGF- β in der Leber erhöht, was zu einer verminderten Expression von CMKLR1 führen würde, und Adiponektin erniedrigt, was ebenso zu einer geringeren Menge an CMKLR1 Protein beitragen würde [26] [52]. Dem widersprechend wurde in den Lebern von Mäusen unter atherogener Paigen-Diät, einer weiteren Diät, welche bei Mäusen zu einer NASH führt, keine veränderte Expression von CMKLR1 Protein nachgewiesen [53]. So mag der Zusammenhang zwischen TGF- β beziehungsweise Adiponektin und CMKLR1 Protein in PHHs bestehen, ob dies jedoch einen Einfluss auf die CMKLR1 Protein-Konzentration in der NASH hat, ist weiter ungeklärt.

Zusammenfassend kann über die Stimulationsversuche von HSCs und LX-2-Zellen mit den genannten Zytokinen, Leptin und Lipopolysaccharid gesagt werden, dass es bei keinem Experiment zu einer veränderten Expression von CMKLR1 Protein kam. Welchen Einfluss die genannten Faktoren auf CMKLR1 in PHHs haben, ist in diesem Abschnitt diskutiert worden. Da die Zusammenhänge jedoch nicht eindeutig und widersprüchlich sind, besteht weiter die Fragen, welche Faktoren CMKLR1 in den Leberzellen regulieren, welche Rolle CMKLR1 in der Pathogenese der NASH hat beziehungsweise ob CMKLR1 überhaupt eine Rolle in der Pathogenese der NASH spielt.

4.3 Regulation von Chemerin Protein durch Zytokine, Leptin und Lipopolysaccharid

Das Adipokin Chemerin scheint nach aktuellem Wissensstand eine Rolle in der Pathogenese der NAFLD zu spielen. So war in einer Untersuchung der Serumspiegel von Chemerin sowohl bei Patienten mit Fettleber als auch bei Patienten mit NASH gegenüber den Kontrollen erhöht [37]. Übereinstimmend mit diesen Daten konnte auch in der Leber von NASH-Patienten eine erhöhte Expression von Chemerin mRNA festgestellt werden. Bei Patienten mit einer Fettleber war jedoch keine solche Erhöhung nachweisbar [38] + [39]. Diesen Erkenntnissen widersprechend publizierten Deng et al. 2013, dass es bei Mäusen unter speziellen Diäten, die als NASH-Modell etabliert sind, zu einer Erniedrigung der Chemerin mRNA in der Leber kommt. Auch konnten sie zeigen, dass in Proben von humanen Fettlebern die Chemerin mRNA-Expression vermindert ist [40]. In dem hier untersuchten Kollektiv ergab die Analyse der hepatischen Chemerin-Level auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression in der NASH [41]. Diese widersprüchlichen Daten zeigen, dass noch nicht geklärt ist, ob es im Rahmen der NASH zu einer Veränderung der Chemerin-Expression in der Leber kommt und falls ja, ob zu einer Erhöhung oder Erniedrigung. Um ein besseres Verständnis über die Zusammenhänge zwischen der Chemerin-Expression und der NASH zu erlangen,

wurden in früheren Arbeiten bereits PHHs und im Rahmen dieser Arbeit HSCs und LX-2-Zellen mit Zytokinen, mit einer erwiesenen Rolle in der NAFLD, und LPS stimuliert.

Versuche mit PHHs zeigten keinen Einfluss von IL-6, Leptin, LPS, TNF- α und TGF- β auf die Expression von Chemerin Protein in den Zelllysaten [39]. Auch bei Untersuchungen auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit IL-6 konnte keine veränderte Menge an Chemerin in den Zelllysaten festgestellt werden [38]. Die hier durchgeführten Versuche zeigten ebenso keine Veränderung der Proteinexpression von Chemerin in den Zelllysaten von HSCs beziehungsweise LX-2-Zellen nach Stimulation mit IL-6, Leptin, LPS, TGF- β und TNF- α .

Bei der Analyse des löslichen Chemerins in den Überständen der stimulierten Zellen ergab sich bei Stimulation von LX-2-Zellen mit LPS eine signifikante Abnahme. Krautbauer et al. konnten keinen Unterschied der Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter PHHs mit LPS nachweisen [39]. Bei Patienten mit NAFLD ist die Permeabilität der Darmwand und die Serumkonzentration an LPS, einem Endotoxin aus dem Darmlumen, erhöht [11] + [19]. Dies könnte zu einer verminderten Freisetzung von Chemerin aus den hepatischen Sternzellen führen und so zu der erniedrigten Expression von Chemerin beitragen, die von Deng et al. 2013 festgestellt worden ist.

Bei Stimulation von HSCs mit TNF- α kam es zu einer Abnahme der Konzentration an löslichem Chemerin-Protein. Übereinstimmend hiermit kam es auch bei PHHs nach TNF- α -Stimulation zu einer verminderten Chemerin-Konzentration in den Überständen [39]. Bei LX-2-Zellen, stimuliert mit TGF- β , deutete sich ein Trend zu einer Abnahme an löslichem Chemerin an. Dem entgegengesetzt, kam es bei Krautbauer et al. 2013 zu einer Zunahme von Chemerin in den Überständen von mit TGF- β stimulierten PHHs [39]. Ebenso kam es bei Stimulation von PHHs mit Leptin zu einer erhöhten Konzentration von Chemerin in den Überständen, was sich bei Stimulation von LX-2-Zellen so nicht zeigte [39]. IL-6 bewirkte weder in LX-2-Zellen noch in PHHs eine Veränderung der Konzentration an löslichem Chemerin [39]. Die Abnahme der Konzentrationen an löslichem Chemerin in den Experimenten mit LPS und TNF- α und der Trend zur Abnahme bei Stimulation mit TGF- β stimmen nicht mit den Ergebnissen der Immunoblot-Analyse der Zelllysate der gleichen Versuche überein. Dies könnte einerseits auf die deutlich höhere Sensitivität der ELISA-Technik im Vergleich mit dem Immunoblot zurückzuführen sein. Andererseits könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass es eine unterschiedliche Regulation von zellulärem und löslichem Chemerin gibt. Weitere Experimente sind notwendig, um dieser noch ungeklärten Frage auf den Grund zu gehen.

5. Zusammenfassung

Es konnte an einem relativ großen NAFLD-Patientenkollektiv gezeigt werden, dass es geschlechtsabhängige Unterschiede in der Expression von CMKLR1 bei NASH-Patienten gibt. So wurde nachgewiesen, dass bei den männlichen Patienten des Kollektivs die hepatische CMKLR1 mRNA positiv mit dem *NASH activity score* und den darin eingehenden Merkmalen Entzündung und Fibrose korreliert. Bei den weiblichen Patienten zeigte sich kein solcher Zusammenhang. Des Weiteren lassen die sowohl in der gesamten Kohorte als auch in beiden Geschlechtern gefundenen schwachen Assoziationen zwischen der CMKLR1 mRNA und der Komorbidität Diabetes mellitus Typ 2 auf einen Zusammenhang schließen. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren und es bedarf hier weiterer Untersuchungen, um einen wirklichen Zusammenhang annehmen oder ablehnen zu können. Auch zeigte sich bei den weiblichen Patienten des Kollektivs ein Trend zu erhöhten CMKLR1 mRNA-Werten bei Patientinnen mit Hypercholesterinämie. Doch auch diese Assoziation ist mit Vorsicht zu interpretieren und es bedarf weiterer Untersuchungen in diese Richtung.

Bei Stimulation von humanen Sternzellen und Zellen der LX-2-Zellreihe mit IL-6, Leptin, TGF- β , TNF- α und Lipopolysaccharid und anschließender Analyse von CMKLR1 mittels Immunoblot in den Zelllysaten, konnte keine Veränderung von CMKLR1 festgestellt werden. Die Studie zeigt somit, dass ein Zusammenhang zwischen der hepatischen CMKLR1 mRNA und der NASH besteht. Dass die hepatischen Sternzellen in diesem Zusammenhang zu der erhöhten CMKLR1-Expression beitragen, scheint auf Grundlage der hier erhobenen Daten unwahrscheinlich. Da jedoch in den Stimulationsversuchen Proteine analysiert wurden und eine differenzielle Regulation von CMKLR1 auf Protein- und mRNA-Ebene diskutiert wird, sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Frage abschließend zu klären.

Bei den Analysen von Chemerin in den obig beschriebenen Stimulationsversuchen zeigten sich keine Veränderungen der Proteinkonzentration in den Zelllysaten. Wurden die Konzentrationen an löslichem Chemerin in den Überständen der Experimente untersucht, konnte eine signifikante Abnahme der Konzentration bei den Stimulationen mit LPS und TNF- α nachgewiesen werden. Bei den Stimulationen mit TGF- β zeigte sich ein Trend zu erniedrigten Konzentrationen von löslichem Chemerin.

Die hepatischen Sternzellen scheinen also mit ein Grund für die veränderten Chemerinkonzentrationen in der Leber und im Serum bei NASH-Patienten zu sein. Da die Ergebnisse der Stimulationsversuche von hepatischen Sternzellen zum Teil den Ergebnissen gleicher Stimulationen mit Hepatozyten widersprechen [39] und diese einen viel größeren

Zellanteil in der Leber besitzen, gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären, wie groß der Einfluss von Konzentrationsänderungen an Chemerin in HSCs auf die gesamte Leber wirklich ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Attar, B.M. and D.H. Van Thiel, Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *ScientificWorldJournal*, 2013. 481893(10): p. 20.
2. Preiss, D. and N. Sattar, Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)*, 2008. 115(5): p. 141-50.
3. Herold, G., *Innere Medizin* 2013, Köln.
4. Brunt, E.M., Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol*, 2007. 20 Suppl 1: p. S40-8.
5. Than, N.N. and P.N. Newsome, A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, 2015. 239(1): p. 192-202.
6. Brea, A. and J. Puzo, Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol*, 2013. 167(4): p. 1109-17.
7. Loria, P., A. Lonardo, and G. Targher, Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis. *Clin Sci*, 2008. 115(1): p. 1-12.
8. Cai, D., et al., Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*, 2005. 11(2): p. 183-90.
9. Ahima, R.S. and J.S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(8): p. 327-32.
10. Sookoian, S. and C.J. Pirola, Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2011. 53(6): p. 1883-94.
11. Biddinger, S.B., et al., Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab*, 2008. 7(2): p. 125-34.
12. Baffy, G., Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol*, 2009. 51(1): p. 212-23.
13. Mouzaki, M., et al., Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2013. 58(1): p. 120-7.
14. Milic, S., D. Lulic, and D. Stimac, Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(28): p. 9330-7.
15. Tardelli, M., et al., Adiponectin regulates aquaglyceroporin expression in hepatic stellate cells altering their functional state. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016. 15(10): p. 13415.

16. Li, J.T., et al., Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol*, 2008. 43(6): p. 419-28.
17. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie* 2010, München: Elsevier GmbH. 596.
18. Tilg, H., The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*, 2010. 28(1): p. 179-85.
19. Ruiz, A.G., et al., Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*, 2007. 17(10): p. 1374-80.
20. Nagpal, S., et al., Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol*, 1997. 109(1): p. 91-5.
21. Wittamer, V., et al., Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*, 2003. 198(7): p. 977-85.
22. Mattern, A., T. Zellmann, and A.G. Beck-Sickinger, Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life*, 2014. 66(1): p. 19-26.
23. Zabel, B.A., et al., Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem*, 2005. 280(41): p. 34661-6.
24. Yamaguchi, Y., et al., Proteolytic cleavage of chemerin protein is necessary for activation to the active form, Chem157S, which functions as a signaling molecule in glioblastoma. *J Biol Chem*, 2011. 286(45): p. 39510-9.
25. Yoshimura, T. and J.J. Oppenheim, Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp Cell Res*, 2011. 317(5): p. 674-84.
26. Wanninger, J., et al., Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 349(2): p. 248-54.
27. Arita, M., et al., Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol*, 2007. 178(6): p. 3912-7.
28. Barnea, G., et al., The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(1): p. 64-9.
29. Migeotte, I., et al., Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations. *Eur J Immunol*, 2002. 32(2): p. 494-501.
30. Zabel, B.A., et al., Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med*, 2008. 205(10): p. 2207-20.

31. Schultz, S., et al., Proteolytic activation of prochemerin by kallikrein 7 breaks an ionic linkage and results in C-terminal rearrangement. *Biochem J*, 2013. 452(2): p. 271-80.
32. Banas, M., et al., Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e58709.
33. Goralski, K.B., et al., Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem*, 2007. 282(38): p. 28175-88.
34. Ernst, M.C., et al., Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology*, 2012. 153(2): p. 672-82.
35. Rouger, L., et al., ChemR23 knockout mice display mild obesity but no deficit in adipocyte differentiation. *J Endocrinol*, 2013. 219(3): p. 279-89.
36. Gruben, N., et al., Chemokine-like receptor 1 deficiency does not affect the development of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*, 2014. 9(4).
37. Kukla, M., et al., Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol*, 2010. 45(2): p. 235-42.
38. Docke, S., et al., Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol*, 2013. 169(5): p. 547-57.
39. Krautbauer, S., et al., Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver. *Exp Mol Pathol*, 2013. 95(2): p. 199-205.
40. Deng, Y., et al., Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Endocrinology*, 2013. 154(5): p. 1794-801.
41. Pohl, R., et al., Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest*, 2017. 47(1): p. 7-18.
42. Zhang, W., et al., PI3K inhibition protects mice from NAFLD by down-regulating CMKLR1 and NLRP3 in Kupffer cells. *J Physiol Biochem*, 2017. 73(4): p. 583-594.
43. Xu, L., et al., Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 2005. 54(1): p. 142-51.
44. Kleiner, D.E., et al., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005. 41(6): p. 1313-1321.
45. Kukla, M., et al., Hepatic chemerin and chemokine-like receptor 1 expression in patients with chronic hepatitis C. *Biomed Res Int*, 2014. 517820(10): p. 10.
46. Pan, J.J. and M.B. Fallon, Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 2014. 6(5): p. 274-83.

47. Browning, J.D., et al., Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1387-95.
48. Bauer, S., et al., Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes. *Endocrinology*, 2011. 152(1): p. 26-35.
49. Kajor, M., et al., Hepatic chemerin mRNA in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Pol J Pathol*, 2017. 68(2): p. 117-127.
50. Baranova, A., et al., Gene expression patterns in hepatic tissue and visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Surg*, 2007. 17(8): p. 1111-8.
51. Coulon, S., et al., Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*, 2012. 59(2): p. 442-9.
52. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol*, 2011. 17(23): p. 2801-11.
53. Pohl, R., et al., Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol*, 2015. 98(2): p. 295-9.

7. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Das Spektrum der NAFLD (nach [2] und [3])</i>	8
<i>Abbildung 2: Mechanismen der Pathogenese der NAFLD (nach [1])</i>	9
<i>Abbildung 3: Aufbau des "Sandwiches" bei dem Wet Transfer Verfahren des Western Blottings.</i>	35
<i>Abbildung 4: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) dargestellt entsprechend der unterschiedlichen Operationsindikationen (M, Metastasen extrahepatischer Tumore; CCC, Cholangiozelluläres Karzinom; HCC, hepatozelluläres Karzinom; FNH, fokale noduläre Hyperplasie; Aden., Adenom) (A), der Kategorien Normalgewicht ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($BMI > 25 \text{ und } < 30 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (B) und dem Geschlecht (C).</i>	41
<i>Abbildung 5: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) in den Proben von Patienten mit gesunder Leber (Kont.), Patienten mit borderline NASH ($N < 5$) und Patienten mit NASH ($N \geq 5$) (A); zusammengenommene Kontrollen und borderline NASH-Patienten im Vergleich mit NASH-Patienten (B);</i>	42
<i>Abbildung 6: Korrelation von CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) mit dem Grad der Entzündung (A), der Fibrose (B) und dem NASH Score (C);</i>	42
<i>Abbildung 7: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) bei allen Patienten des Kollektivs ohne und mit Typ 2 Diabetes (noT2D / T2D) (A); CMKLR1 mRNA bei NASH-Patienten ohne und mit Typ 2 Diabetes (B);</i>	43
<i>Abbildung 8: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) in weiblichen NAFLD-Patienten dargestellt entsprechend der Kategorien Normalgewicht ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($BMI > 25 \text{ und } < 30 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (A) und nach Patienten mit gesunder Leber (Kont.), borderline NASH ($N < 5$) und NASH ($N \geq 5$) (B);</i>	44
<i>Abbildung 9: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) in weiblichen NAFLD-Patienten: Korrelation mit dem Grad der Fibrose (A); CMKLR1 bei Patientinnen ohne (noHC) und mit (HC) Hypercholesterinämie (B) und ohne (noT2D) und mit (T2D) Typ 2 Diabetes (C);</i>	44
<i>Abbildung 10: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) in männlichen NAFLD-Patienten dargestellt entsprechend der Kategorien Normalgewicht ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($BMI > 25 \text{ und } < 30 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (A); zusammengenommene Kontrollen und borderline NASH-Patienten im Vergleich mit NASH-Patienten (B);</i>	45
<i>Abbildung 11: CMKLR1 mRNA (normalisiert auf 18S rRNA) in männlichen NAFLD-Patienten: Korrelation mit dem Grad der Fibrose (A); CMKLR1 bei Patienten ohne (noT2D)</i>	

<i>und mit (T2D) Typ 2 Diabetes (B) und ohne (noHC) und mit (HC) Hypercholesterinämie (C);</i>	46
<i>Abbildung 12: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten von unstimulierten HSCs und LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle</i>	47
<i>Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	48
<i>Abbildung 14: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	48
<i>Abbildung 15: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	49
<i>Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	49
<i>Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	49
<i>Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von CMKLR1 in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	50
<i>Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten von unstimulierten HSCs und LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	51
<i>Abbildung 20: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	52
<i>Abbildung 21: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen.</i>	52
<i>Abbildung 22: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	53
<i>Abbildung 23: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen.</i>	53
<i>Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	53
<i>Abbildung 25: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen. * zeigt einen p-Wert < 0,05, verglichen mit den Kontrollen, an.</i>	54
<i>Abbildung 26: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	54
<i>Abbildung 27: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	54
<i>Abbildung 28: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter LX-2-Zellen.</i>	55

<i>Abbildung 29: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter HSCs. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 30: Western-Blot-Analyse von Chemerin in den Zelllysaten stimulierter LX-2-Zellen. GAPDH dient der Ladungskontrolle.</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 31: Chemerin-Konzentration in den Überständen stimulierter HSCs. * zeigt einen p-Wert < 0,05, verglichen mit den Kontrollen, an.</i>	<i>56</i>

8. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper.</i>	24
<i>Tabelle 2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.</i>	24
<i>Tabelle 3: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme.</i>	25
<i>Tabelle 4: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.</i>	25
<i>Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen.</i>	26
<i>Tabelle 6: Die in dieser Arbeit für Stimulationsversuche verwendeten Substanzen.</i>	26
<i>Tabelle 7: Die in dieser Arbeit für Stimulationsversuche verwendeten Lösungsmittel und Konzentrationen der Substanzen.</i>	29
<i>Tabelle 8: Die einzelnen Charakteristika und Laborwerte der Kohorte sind als Median angegeben, der Wertebereich in Klammern. Signifikante Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit einem NAS < 5 sind angegeben mit *, zwischen Kontrollen und Patienten mit einem NAS ≥ 5 mit # und zwischen Patienten mit einem NAS < 5 und einem NAS ≥ 5 mit &. Die hochgestellten Zahlen geben die Anzahl der Patienten an, für diese die Werte festgehalten worden waren, falls die Werte nicht für alle Patienten verfügbar waren.</i>	40

9. Publikationen

Neumann M, Meier EM, Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, Aslanidis C, Pohl R, Weiss TS, Buechler C: Chemokine-like receptor 1 mRNA weakly correlates with non-alcoholic steatohepatitis score in male but not female individuals. *Int J Mol Sci*. 2016 Aug.

Pohl R, Haberl EM, Rein-Fischboeck L, Zimny S, **Neumann M**, Aslanidis C, Schacherer D, Krautbauer S, Eisinger K, Weiss TS, Buechler C: Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest*. 2017 Jan.

Rein-Fischboeck L, Pohl R, Haberl EM, Zimny S, **Neumann M**, Eisinger K, Weiss TS, Krautbauer S, Buechler C: Tubulin alpha 8 is expressed in hepatic stellate cells and is induced in transformed hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. 2017 Apr.

Danksagung

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Christa Bächler für die sehr gute Betreuung, wertvolle Anregungen, die Geduld bei Fragen und Problemen und die stets offene Tür bedanken. Auch möchte ich mir dafür bedanken, dass sie mir die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat und stets hinter dieser Arbeit gestanden ist.

Bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Vielen Dank auch an die Teammitglieder Dr. Kristina Eisinger, Dr. Lisa Rein-Fischböck, Dr. Rebekka Pohl, Dr. Sabrina Krautbauer und besonders Dr. Elisabeth Haberl für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft, das stets offene Ohr bei Fragen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

